

UNIVERSITE DE BLIDA -1
FACUTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIES



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de Master
Académique
Spécialité : système de production agro écologique

Thème

**CARACTERISATION CULTURALE IN-VITRO DU *Verticillium sp* AGENT DE LA
VERTICILLIOSE EN HORTICULTURE**

Présenté par :

ROUAINIA BOUTAYNA

Devant le jury composé de :

Y.MOUAS	M.C.B	U.Blida I	Présidente
BENKORTEBY	M.A.B	U.Blida I	Examinatrice
F.BOUCENAK	M.C.B	U.Blida I	Promotrice
H.DEGAICHIA	D.R	U.Blida I	Co-promoteur

Année Universitaire 2019 |2020

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier avant tout Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, la patience, la santé et le courage pour accomplir ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon travail et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements à ma promotrice Mme F. BOUCHENAK et mon Co-promoteur Mr H. DEGAICHIA qui ont assuré le suivi scientifique de ce travail et qui m'ont guidé avec leur expérience et leurs conseils.

Mes plus vifs remerciements vont aux membres du jury Mme MOUAS et Mme BENKORTEBY qui m'ont fait l'honneur d'accepter de lire mon travail.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A la personne qui m'a donné le goût du savoir et de la réussite :

A ma mère

A mon père

A mes frères et ma sœur

A toutes mes amies

Je dédie ce mémoire

Bouthaina

CARACTERISATION CULTURALE IN-VITRO DU *VERTICILLIUM SP* AGENT DE LA VERTICILLIOSE EN HORTICULTURE

Résumé

La flétrissure verticillienne causée par *Verticillium dahliae* Kleb est une maladie tellurique qui attaque de nombreuses cultures.

L'effet de quelques facteurs environnementaux à savoir le pH, NaCl, PEG sur la croissance mycélienne pondérale et les activités biologiques in vitro de deux isolats de *Verticillium sp* prélevés de la culture de tomate en provenance de la région de Tébessa et de Tlemcen a été étudié dans ce travail

La détermination *in vitro* de l'influence du pH du milieu, la concentration en PEG et en NaCl souligne une variabilité de réponse chez les 02 isolats étudiés.

l'activité enzymatique B-1,4 glucosidase de l'isolat pathogène V124 est supérieure à celle de l'isolat pathogène Vx en milieu acide et basique ,le pH du milieu semble donc stimule la production d'enzyme in vitro chez les deux isolats de *verticillium* , l'isolat V124 semble plus efficient pour la production d'enzyme dans nos conditions expérimentales.

Nos résultats ont montré que les niveaux de salinité testés (2g/L, 4g/L, 9g/L) n'avaient pas d'effet négatif sur la croissance mycélienne pondérale et les quantités de protéines produites nous observons une diminution de la quantité de protéines produite à 9g/L et une stimulation de la croissance mycélienne pondérale chez l'isolat V124

La corrélation de Person au seuil de 1% et 5 % indique qu'il existe une corrélation significative ($p=0,00$) entre l'activité B-1,4 glucosidase et l'activité endo-B-1,4 glucanase.

L'effet du PEG sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du *Verticillium sp* montrent une diminution de L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase sauf pour l'isolat V124 à une concentration de 2g/L

Mots clés : Verticillium sp, isolat, facteurs abiotique, croissance

In vitro cultural characterization of *Verticillium sp* agent of verticilliose in horticulture

ABSTRACT

Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* is a telluric which attacks many cultures

The effect of some environmental factors namely pH, NaCl, PEG on the mycelia growth and in vitro biological activities of two isolates of *Verticillium* taken from the tomato crop from the regions of Tebessa and Tlemcen was studied in this work in vitro determination of the influence of the pH of the medium, the concentration of PEG and NaCl highlights a variability of response in the two isolates studies

The enzymatic activity B-1, 4 glucosidase of the pathogenic isolate V124 is superior to that of the pathogen isolate in acid and basic pH

Of the medium seems to stimulate the production of the enzyme in vitro in both isolates, V124 isolate appears to be, more efficient for enzyme production in our experimental conditions, our result showed that the salinity levels tested (2g/L, 4g/L, 9g/L) had no negative effect on mycelia weight growth and the quantities of protein produced we observe a decrease in the amount of protein 9/L and stimulation of mycelia growth in the isolate V124

our results on the enzymatic activity show a decrease in enzymatic activity of glucosidase except for isolate V124 to a concentration of 2g/L the present results have shown that the enzymatic activity glucanase decrease at a dose of 2g/L and increases at a dose of 4g/L.

Key words: *Verticillium sp*, isolates; abiotic factors, growth

ملخص

إن الذبول الناجم عن *Verticillium dahliae* هو مرض يصيب العديد من المحاصيل الزراعية. في هذا العمل تمت دراسة تأثير بعض العوامل البيئية درجة الحموضة, ملوحة الوسط, PEG على نمو *Mycélium*, والنشاطات البيولوجية المختبرة على عزلتين مأخوذتين من منطقة تبسه و تلمسان تأثير درجة الحموضة و ملوحة الوسط , PEG ينتج على ذلك وجود تباين بين العازلتين تأثير درجة الحموضة على النشاط الإنزيمي لدى العزلة 124 أعلى من العزلة Vx في الوسط الحمضي و الوسط الأساسي لذا يبدو إن تأثير درجة حموضة الوسط تحفز إنتاج الإنزيمات لدى العزلتين, العزلة 124 تبدو أكثر كفاءة لإنتاج الأنزيم في ظروفنا التجريبية أظهرت نتائجنا أن مستويات الملوحة التي تم اختبارها ليس له تأثير سلبي على النمو و على كمية البروتين الناتجة نلاحظ انخفاض كمية البروتين عند الجرعة 9g/L و تحفيز نمو الخلية عند العزلة 124 إن تأثير PEG على النشاط الإنزيمي ينتج عنه انخفاض الإنزيمات ما عدا العزلة 124 عند الجرعة 2g/L

الكلمات المفتاحية : عزلة , عوامل بيئية, *Verticillium sp* , النمو

TABLE DE MATIERE

Introduction	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1.Verticilliose.....	3
I.2.L'agent pathogène <i>verticillium dahliae</i>	3
I.3.Importance économique de la verticilliose dans le monde et en Algérie.....	4
I.4.Description de l'agent causal.....	5
I.4.1.Caractérisation morphologique.....	5
I.4.2.Classification.....	6
I.5.Gamme d'hôtes.....	7
I.6.Cycle épidémique de la maladie.....	8
I.7.Mécanisme de transmission et dispersion.....	9
I.8.Symptômes de la maladie.....	10
I.8.1. Symptômes observés sur tomate.....	10
I.8.2.Symptômes observés sur Oliver.....	11
I.8.3.Symptômes observés sur fraisier.....	12
I.9.Les moyens de lutte.....	12
I.9.1.Les moyens de lutte culturale.....	12
I.9.2.Les moyens de lutte chimique.....	13
I.9.3.Les moyens de lutte physique.....	13
I.9.4.Les moyens de lutte biologique.....	13
I.10. Influence des facteurs abiotique sur la croissance, la sporulation et pathogénicité des agents pathogènes telluriques.....	14
I.10.1.Influence de pH.....	14
I.10.2.Influence de la température.....	15
I.10.3.Influence de la salinité.....	16

I.10.4. Influence de la lumière.....	16
I.11. Influence des facteurs abiotiques sur les activités biologiques.....	16

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. objectif de l'expérimentation.....	18
II.2. Matériel fongique.....	18
II.3. étude de quelques facteurs physiologique sur la croissance et l'activité enzymatique de deux isolats de <i>verticillium sp.</i>	19
II.3.1. Influence du pH.....	20
II.3.2. Influence de NaCl.....	21
II.3.3. Influence du polyéthylène glycol.....	22
II.3.4. Paramètres étudié.....	22
II.3.4.1. Effets des facteurs environnementaux sur la croissance mycélienne pondérale.....	23
II.3.4.2. Influence des facteurs environnementaux sur la quantité de protéines produites in vitro dans les filtrats de cultures des deux isolats de <i>verticillium sp 26</i>	
II.3.4.3. Essai enzymatiques.....	23
1-L'activité endo-B-1,4-glucanase.....	24
2-L'activité B-1,4 glucosidase.....	24
II.4. Analyse statistique des données.....	25

CHAPITRE III : RESULTAT ET DISCUSSION

III.1.1. Détermination de la croissance mycélienne pondérale en fonction du pH du milieu.....	27
III.1.2. effet du pH sur la quantité de protéines produite in vitro dans les filtrats de culture des deux isolats de <i>verticillium sp.</i>	27
III.1.3. effet du pH sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase.....	29
III.1.4. effet du pH sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase.....	31
III.2.1. Détermination de la croissance mycélienne pondérale en fonction de la concentration en sel du milieu.....	33
III.2.2. effet de NaCl sur la quantité de protéines produite in vitro des deux isolats de <i>verticillium sp.</i>	34
III.2.3. effet de NaCl sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase.....	36
III.2.4. effet de NaCl du milieu sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase....	38
III.3.1. Effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale.....	40

III.3.2. effet du polyéthylène glycol sur la quantité de protéines produite in vitro des deux isolats de <i>verticillium sp.</i>	42
III.3.3. effet du polyéthylène glycol sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase....	44
III.3.4. effet du PEG sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase.....	46
III.4. Effet des traitements sur la corrélation des paramètres étudiés.....	48
III.5.DISCUSSION	50
III.5.1.Effet du pH sur la croissance mycélienne pondérale et la quantité de protéines produites et l'activité enzymatique in vitro.....	50
III.5.2. Effet de NaCl sur la croissance mycélienne pondérale et sur la quantité de protéines produites et l'activité enzymatique.....	51
III.5.3. Effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale et sur la quantité de protéines produites et l'activité enzymatique.....	54
Conclusion	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	57
ANNEXE	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : morphologie des conidiophores (a) phialides, (b) conidies de <i>v.dahliae</i> (c) (Luis ,2001).....	6
Figure 2 : Détail au microscope photonique des microsclérotos formés par <i>Verticillium dahliae</i> (D.Blancard ,2015).....	7
Figure 3 : cycle de développement du <i>V.dahliae</i> <i>Kleb</i> (Berlanger et Powelson, 2000).....	9
Figure 4 : jaunissement du limbe (Blancard ,2013).....	11
Figure 5: Brunissement des feuilles (Blancard ,2013).....	11
Figure 6 : Brunissement des vaisseaux de la tige (Blancard ,2013).....	11
Figure 7 : dessèchement et flétrissement des branches d'Oliver (Levin, 2003).....	13
Figure : 8 : Aspect macroscopique et microscopique (X400) du <i>Verticillium sp</i> : conidiophores et conidies (Degaichia, communication personnel	23
Figure 9: des tubes à essai contenant l'échantillon.....	24
Figure 10 : les cultures ont été incubées sous agitation.....	24
Figure 11 : Dispositif de filtration sous vide.....	25
Figure 12 : Formation du complexe coloré entre le bleu brillant de Coomassie et les protéines.....	26
Figure III.1 : effet du pH du milieu sur la croissance mycélienne pondérale (mg Ms) 30	
Figure III.2 effets du pH sur la teneur en protéines des deux isolats de <i>verticillium sp</i> (mg \g Ms).....	32
Figure III.3 : effets du pH sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du <i>Verticillium sp</i> ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de <i>D</i> -nitrophényle\g MS).....	34
Figure III.4 : effets du pH sur L'activité enzymatique endo- B-1,4 glucanase du <i>Verticillium sp</i> ($\mu\text{mol}/\text{min}$ eq.Glucose g Ms).....	36

Figure III.5. : Effet du Nacl sur la croissance pondérale mycélienne du <i>verticillium sp</i> (mg Ms).....	37
Figure III.6 : effets de Nacl sur la teneur en protéines des deux isolats de <i>verticillium sp</i> (mg \g Ms).....	39
Figure III.7 : effet de Nacl sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du <i>verticillium sp</i> ($\mu\text{mol}\text{min}$ de <i>D</i> -nitrophényle\g MS).....	41
Figure III .8 : effet de Nacl du milieu sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase <i>Verticillium sp</i> ($\mu\text{mol}\text{min}$ eq.Glucose g Ms).....	48
Figure III.9 : Effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale du <i>verticillium sp</i> (mg MS).....	44
Figure III.10: effet du PEG sur la quantité de protéines produite in vitro des deux isolats de <i>verticillium sp</i> (mg \g Ms).....	45
Figure III.11 effet du polyéthylène glycol sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du <i>verticillium sp</i> ($\mu\text{mol}\text{min}$ de <i>D</i> -nitrophényle\g MS).....	47
Figure III.12 : effet du PEG sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase du <i>verticillium sp</i> ($\mu\text{mol}\text{min}$ eq.Glucose g Ms).....	49
Figure 3.13 : Représentation schématique de l'influence des facteurs de l'expérimentation sur les paramètres de l'étude.....	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : classification du champignon <i>verticillium dahliae</i> (Fradin et Thomma, 2006 ; Lopez et Mercado ,2010 ; Martin ,2011).....	6
Tableau I.2 : origine des isolats de <i>Verticillium sp.</i>	22

Introduction

La verticilliose est une maladie fongique vasculaire (trachéomycoses) causée par des *ascomycètes* du genre *verticillium*, les parasites de ce genre comme *Verticillium dahliae* Kleb et *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold se rencontrent fréquemment sous les climats tempérés ou ils attaquent une large gamme d'espèces cultivées ou ornementale.

La colonisation des tissus par le parasite est rendue aisée par la production d'enzymes de dégradation des parois cellulaires de l'hôte (**Cooper et al ,1978 ; Durand &Cooper ,1988**). Une corrélation positive existe entre l'activité des cellulases et des pectinase produites par des isolats de *Verticillium* et leur agressivité vis-à-vis de leur plantes hôtes (**Gupta & Heale, 1971, Durand &Cooper, 1988**). En outre ce champignon est apte à produire des métabolites toxiques à l'intérieur des tissus infectés et qui seraient impliqués dans l'expression des symptômes de la maladie (**Nachmias et al ,1982 ; Meyer et al, 1984**).

Le développement des champignons phytopathogènes du sol dépend du comportement de la population des plantes hôte et des caractéristiques de l'environnement. Les fluctuations de l'une ou l'autre de ces caractéristiques peuvent agir sur le développement et les activités biologiques de ces agents pathogènes leur agressivité pathogénicité ainsi que sur la relation hôte-parasite, (**Derakhsan et al, 2008 ; Jabnoun, 2010**).

La variabilité des caractères morphologiques et physiologiques des isolats de *verticillium sp* peut changer en fonction de la nature du milieu, de son pH, de l'aération, la salinité du sol, la température et de la lumière. (**Ouattara, 2017, Mokhtari 2018**) Ainsi que la croissance mycélienne pondérale et les activités biologiques (**Regragui, 2005**).

Pour cela il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de quelques facteurs environnementaux à savoir le pH, NaCl, PEG (agent stressant osmotique) sur la croissance mycélienne pondérale et les activités biologiques in vitro de deux isolats de *Verticillium sp*.

Les résultats préliminaires obtenus pourront servir aux travaux futurs destinés à évaluer le pouvoir pathogène de ces deux isolats en fonction de la plante hôte

(sensible ou résistante) et de son origine géographique et ainsi à élaborer une stratégie de lutte contre le développement de cette espèce sur différentes plantes hôte.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Verticilliose :

La verticilliose est une maladie cryptogamique dont l'agent étiologique est un champignon tellurique appelé *verticillium dahliae kleb* (Klebahn ,1913.).

C'est l'une des maladies la plus dévastatrice dans le monde elle touche des centaines d'espèces différentes de plante qui sont à une haute valeur dans le domaine agricole (klosterman et al ,2009.)

Cette maladie est plus développée dans les régions tempérées et moins fréquemment dans les régions subtropicales, enfin elle est rare dans les régions tropicales du monde (Inderbitzin et al ,2011.).

I.2.L'agent pathogène : *Verticillium dahliae Kleb*

V.dahliae est l'agent pathogène responsable de la *verticilliose* (ou *flétrissement verticillien*) chez plus de 400 plantes hôtes tel que la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), l'artichaut (*cynara scolymus*), la tomate (*solanum lycopersicum*), la laitue (*lactuca sp*), le poivron (*capsium annum*), l'aubergine (*solanum melongena*), la fraise (*Fragoria vesca*) et l'olivier (*Olea europaea L.*) et Plusieurs espèces d'arbustes et d'arbres (Bhat et subbarao, 1999, Pegg et Brady, 2002.)

Le *verticillium* est un redoutable champignon phytopathogène causant le flétrissement sévère, la mort et le nanisme des plantes ayant survécu à l'attaque. (El aissami et al, 2014).

Il comporte deux espèces *verticillium dahliae kleb* et *verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold (1879) qui sont très répandues dans le sol (Blancard, 1988).

I. 3. Importance économique de la verticilliose dans le monde et en Algérie

de toutes les espèces du genre *Verticillium*, *V. dahliae* est la plus néfaste à cause de son large spectre d'hôtes et de la persistance de ces microscférates. dans le monde la verticilliose est la maladie la plus destructrice en ce qui concerne les cultures de tomate et la deuxième en ce qui concerne la pomme de terre. les cultures les plus touchées en termes de pertes annuelles sont de loin la tomate et la pomme de terre avec une perte annuelles mondiale estimée à plus de 700 millions d'euros

Plante hôte	Production annuelle globale (moyenne 2005-2010)		Perte estimée		Perte maximale
	Mio. \$	Mio. Tonnes	Mio. Tonnes	Mio. \$	%
Tomate	71,07	140,95	1,41	710,72	70
Pommes de terre	70,7	326,02	3,26	707,03	50
Coton	35,47	23,52	0,24	354,72	30
Colza	20,65	54,98	0,55	206,53	50
Pastèque	21,16	95,62	0,96	211,61	
Olivier	21,05	17,7	0,18	210,46	75
Piments et poivrons	17,88	27,65	0,28	178,77	20
Concombre	17,26	55,53	0,56	172,6	
Choux	16,89	64,66	0,65	168,93	
Laitue	13,95	23,56	0,24	139,47	100
Tabac	12,48	6,69	0,07	124,78	30
Aubergine	12,22	38,32	0,38	122,15	70
Tournesol	10,33	31,7	0,32	103,3	55
Fraise	8,75	4,14	0,04	87,48	
Epinards	6,41	17,16	0,17	64,1	
Chou-fleur (et brocoli)	6,39	18,56	0,19	63,93	
Pistachier	3,26	0,73	0,01	32,62	
Avocat	3,01	3,73	0,04	30,08	
Lentilles	1,96	3,07	0,04	19,61	
Artichaut	1,15	1,44	0,01	11,45	
Houblon	586	0,13	0	5,86	100
Alfalfa	nb	nb	nb	nb	50

Données compilées par Magda Siebold (non publié) d'après les chiffres du
FAO Données présentées au 11 th International *Verticillium* Symposium 2013

I.4. Description de l'agent causal :

1. Caractérisation morphologique

Le champignon porte des conidiophores disposés en verticilles autour de l'axe principal de l'hyphe, une phialide se trouve à l'extrémité de chacune de ces branches et les conidies sont formées une par une à l'extrémité des phialides.

Par ailleurs, *V. dahliae* produit sous certaines conditions des microsclérotos cette particularité permet de le distinguer de *verticillium albo-atrum* un autre pathogène causant des symptômes similaires sur les plantes (**Pegg et Brady ,2002 .**).

Les microsclérotos sont des structures de survie formées par l'agglomération d'hyphes contigus dont les parois sont épaissies et mélanisées. Les agglomérats formés ont l'aspect de petites boules noires (entre 20 et 200 pm de diamètre (figure1) pouvant être séparées des hyphes. Leur germination peut être induite artificiellement sur certains milieux sélectifs. Leur persistance dans le sol varie de 4 à 15 ans (**Hawke et Lazarovits, 1994 ; Pegg et Brady ,2002**).

Le genre *verticillium* appartient au groupe des champignons imparfait et possède deux types de spores:

-Les microconidies, unicellulaires ovales (4-6 μ m 2-3 μ m) contenues dans une gouttelette muqueuse, portées à l'extrémité des phialides (sphérule).

-les microsclérotos, de forme et de tailles variables, reconnaissables par leur couleur noire, due à un pigment : la mélanine. Ils se forment par l'augmentation de taille, épaississement et mélanisation de la paroi des hyphes (**Goudou et Sinha ,1988**).

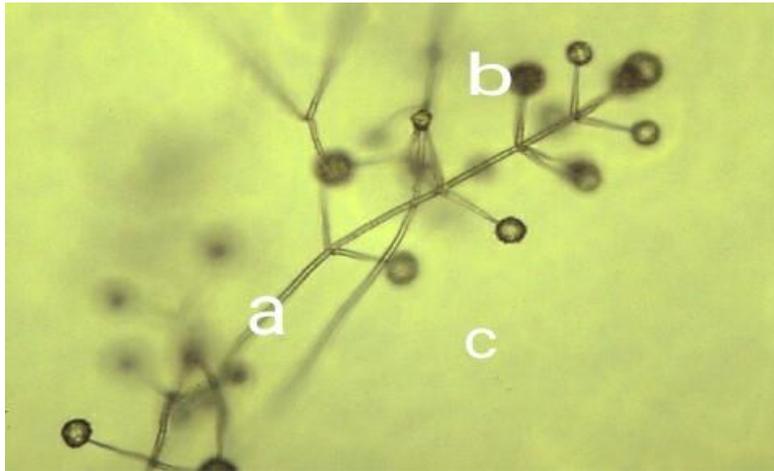


Figure 1 : morphologie des conidiophores (a) phialides, (b) conidies de *v.dahliae* (c) (Luis ,2001).

3.2. Classification :

Le genre *verticillium* fait partie du groupe des *Ascomycètes* il a été mis en évidence pour la première fois en 1816 par Nees Von Esenback (**Isaak ,1967**).

Tableau 1 : classification du champignon *verticillium dahliae* (Fradin et Thomma 2006)

Régne	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycètes</i>
Ordre	<i>Phyllachorales</i>
Famille	<i>Plectosphaerellacea</i>
Genre	<i>Verticillium</i>
Espèce	<i>dahliae</i> (Kleb)

Le genre *verticillium* contient dix espèces phytopathogènes vasculaires des dicotylédones avec des conidiophores verticillés qui produisent des structures de dormance de couleur brune : *v.dahliae*, *v.albo-atrum*, *v.alfalfae*, *v.longisporum*, *v.nonalfalfae*, *v.tricorpus*, *v.zaregamsianum*, *v. nubilum*, *v.*, *v. isaacii* et *v.klebahnii*.

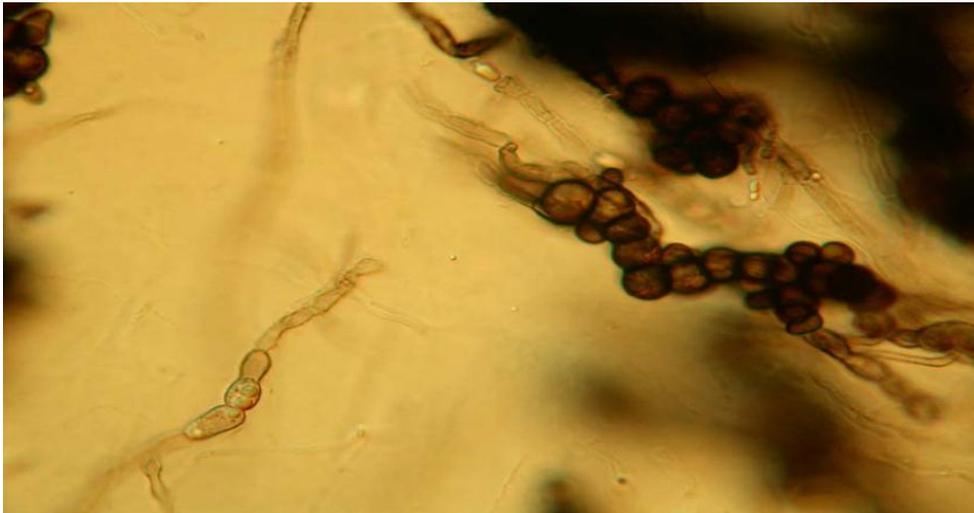


Figure 2 : Détail au microscope photonique des microsclérotés formés par *Verticillium dahliae* (D.Blancard ,2015).

I.5.Gammes d'hôtes :

Le *dahlia* fut la première plante hôte qui a été attaquée par *v.dahliae* (Isaac ,1976.).

Ce parasite est extrêmement polyphage puisqu'il peu attaquer plus de 400 espèces de plantes appartenant à des genres et familles différentes dont beaucoup ont un intérêt agricole et économique (Martin ,2011.) comme des arbres fruitières (l'olivier , l'amandier, l'abricotier, le pêcher le prunier, le noyer et l'avocatier) (Tjamos,1989.) ,des plantes herbacés aussi bien maraichères (pomme de terre tomate, luzerne et aubergine) (Fradin et Thomma ,2006 ,Wang et al,2012),des légumes (chou-fleur ,artichaut, laitue concombre, betteraves ,gombo, rhubarbe) (jamos ,2000 .)

D'autres cultures : coton, melon, pastèque, colza, érable soja, menthe et tabac (**Véronese et al, 2003.**).

I.6.cycle épidémique de la maladie :

Le cycle de développement de *V.dahliae* Kleb se déroule en deux phases : une phase saprophytique (non parasitaire) et une phase parasitaire (figure3)

La phase non parasitaire :

Les microsclérotés sont les structures de survie dans le sol pendant la phase non parasitaire du cycle de vie de *V.dahliae* Kleb en plus ils représentent la forme principale de dispersion ainsi que les propagules infectieuses primaires. Ces structures de résistances peuvent résister aux facteurs biotiques et abiotiques défavorables se trouvant habituellement dans le sol et restent viables pour un maximum de 15 ans en attendant que les conditions environnementales soient favorables. En revanche, les hyphes et les conidies de *V.dahliae* Kleb perdent leur viabilité dans le sol pendant une courte période de temps (**Prieto et al, 2009.**).

La phase parasitaire :

Cette phase du cycle biologique de *V.dahliae* commence avec la germination du microsclérote dans le sol, stimulée par la présence d'exsudat racinaire de plantes sensibles. Cette germination donne lieu à la formation d'hyphes qui pénètrent dans les racines (figure3).

La pénétration d'hyphes infectieux dans le système racinaire se fait par les blessures produites naturellement (nématode) ou par les dommages causés par l'homme (pratique culturale) (**Heinz et al, 1998 .**), et ils se développent via la sève les vaisseaux du xylème, infection primaire (**Fradin et Thomma ,2006**). Le parasite se reproduit asexuellement dans les vaisseaux à l'intérieur desquels il progresse grâce au transport de conidies par le flux de la sève ascendante aux pièces aériennes de la plante (**Vallad et Subbarao, 2008**) ou elles constituent des foyers secondaires d'infection (figure3). La poursuite ainsi de l'infection du système vasculaire et les toxines émises par le parasite font que la plante produise des dépôts gommeux qui obstruent les vaisseaux conducteurs y entravant ainsi le transport d'eau

(Klosterman et al ,2009) et donc des symptômes de flétrissement se déclenchent sur les partie aériennes atteintes (figure 3) (Tombesi et al ,2007 ;Laoune et al ,

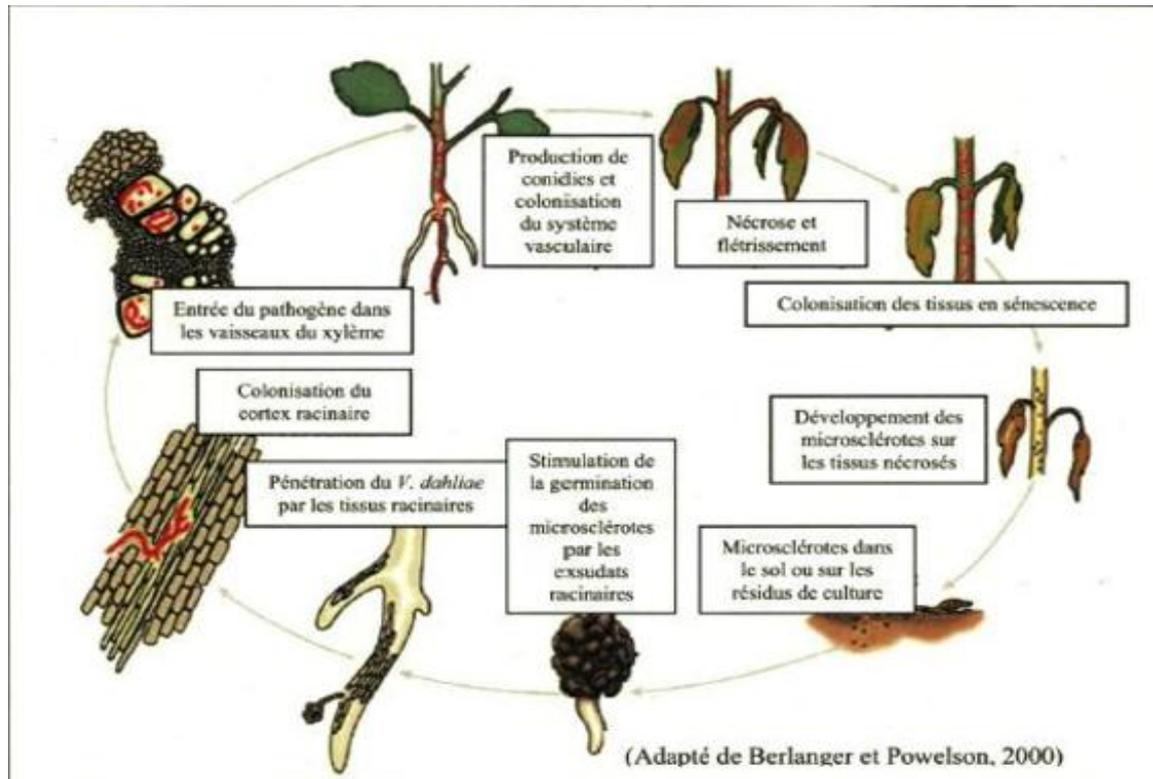


Figure 3 : cycle de développement du *V.dahliae* Kleb (Berlanger et Powelson, 2000).

I.6.Mécanisme de transmission et dispersion :

Les résidus de cultures constituent le premier facteur de la propagation de cette maladie (Dobinson et al ,1998.).

Les pathogènes du sol ne se disséminent pas facilement sur de longue distances, l'introduction dans un champ dépend donc beaucoup des pratiques culturales

En effet, le transport de terre de plantes avec un sol d'accompagnement (bulbes et tubercules), de graines, de débris végétaux de greffon, de plante de pépinière ou de toute autre matériel végétal contaminée et le mode de dissémination le plus courant

vers de nouvelles zones de cultures, la dissémination peut aussi se faire par le vent et l'eau d'irrigation (**Pegg et Brady,2002.**)

Le plus rapide moyens de transmission de *verticillium* reste le contacte racinaire, toutefois les outils contaminés jouent aussi un rôle important dans la contamination de plantes saines (**Acharya et Huang, 2003.**)

I.8. Symptômes de la maladie :

1. Symptômes observée sur tomate :

Les attaques de *verticilliose* sur tomate se traduisent par le flétrissement des plantes au moment les plus chauds de la journée, les folioles ne tardent pas à présenter un jaunissement internervaire du limbe qui prend la forme d'un v (figure4).

Progressivement les tissus foliaires se nécrosent et se dessèchent dans la partie centrale de la décoloration (figure5).

Au fur et à mesure de la progression de la maladie plusieurs folioles et feuilles montrent des symptômes comparables.

Une coupe longitudinale dans la tige permet de constater que les vaisseaux sont plus ou moins bruns (figure7), (**Blancard, 2013.**)



Figure 4 : jaunissement du limbe (**Blancard ,2013.**)



Figure 5 : Flétrissements des feuilles (**Blancard ,2013.**)



Figure 6 : Brunissement des vaisseaux de la tige (**Blancard ,2013**).

2. Symptômes observés sur olivier :

Le *v.dahliae* affecte en premier temps les racines de jeunes plantes, colonise les cellules du xylème et du phloème, puis les tiges ainsi que les feuilles par le flux de la sève, cela provoque des lésions vasculaires avec des perturbations circulaires qui se traduisent par deux types de symptômes :

Le dépérissement rapide et le dépérissement lent, (**Jabnoun-Khiareddine et al. 2007**)

Le dépérissement rapide :

Ce syndrome se caractérise par un dessèchement rapide impliquant un flétrissement sévère des branches principales et secondaires qui se produit principalement de la fin de l'hiver au début du printemps.

Les premières feuilles deviennent chlorotiques puis tournent à un brun clair et subissent dans certains cas des enroulements vers l'intérieure, tout en restant attachées aux branches (**Lopez-Escudero et al .2007**).

Le dépérissement lent :

Se caractérise par une nécrose des inflorescences, les fleurs se momifient et restent attachées à la tige

Les feuilles sur les pousses affectées prennent la couleur vert terne et tombent avant le flétrissement, l'écorce des pousses affectées deviennent brun rougeâtres et les tissus vasculaires intérieurs montrent une coloration brun foncé

Les symptômes apparaissent au printemps et progressivement lentement jusqu'à au début de l'été. (**Jabnou-Khiareddine et al. 2007**)



Figure 7 : dessèchement et flétrissement des branches d'Oliver (Levin, 2003).

7.3. Symptômes observés sur fraisier :

Chez le fraisier les symptômes de la maladie apparaissent tout d'abord dès la première année de culture on remarque tout d'abord le flétrissement des feuilles matures en périphérie du collet, puis le nanisme du plant.

Des baisses de rendement en fruits et éventuellement la mort de la plante, une coloration caractéristique des tissus vasculaires peut être observé à l'œil nu sur une coupe transversale des collets des plants de fraisier affectés par la maladie.

Les champs gravement affectés par *v.dahliae* ne peuvent plus être économiquement viables puisque le pathogène peut persister dans le sol pendant de nombreuses années même en l'absence de la plante hôte. **(Mass ; 1998).**

I.9. Les moyens de lutte :

1. Les moyens de lutte culturale :

Les rotations culturales avec des plantes non hôtes essentiellement des céréales ont été souvent utilisées, dans la diminution des propagules dans le sol, cependant leur

efficacités est très discutées en raison du mode de conservation du champignon dans le sol sous forme de microsclérotés, ces derniers ont une longévité de plusieurs années et peuvent contaminer les plantes adventices non hôtes ce qui contribue à l'augmentation de l'inoculum dans le sol (**Pullman, Devay ,1981**).

2.Les moyens de lutte chimique :

Les moyens de lutte chimique contre *verticillium* ont connu beaucoup de succès.

Les fongicides à l'instar du benlate, du propiconazole et du paclobutrazal inhibent la croissance mycélienne du parasite et réduisent significativement la sévérité de la maladie en diminuant la population verticillienne à l'intérieur des tiges (**Erwin ,1981**.) Néanmoins le traitement chimique ne constitue pas le remède idéal compte tenu des problèmes inhérents à l'environnement, à la toxicité des produits chimiques vis-à-vis de l'homme et des animaux et à la possibilité d'apparition de pathotypes résistants aux fongicides (**Benyacoub, 1993**).

3.Les moyens de lutte physique :

La solarisation des sols est une méthode efficace dans la réduction de l'inoculum de *verticillium* elle consiste à couvrir le sol avec des bâches en polyéthylène pendant la période la plus chaude de l'année de juin à août, ainsi les organes de conservation présents jusqu'à une profondeur de 30cm sont soumis à des températures pouvant atteindre 50°C (**Bourbos et Skoudridakis, 1996**).

4.Les moyens de lutte biologique :

La lutte biologique consiste à réduire l'activité pathogène en mettant un ou plusieurs organismes, ces organismes incluent l'agent pathogène lui-même, la plante, les organismes antagonistes, deux procédés de lutte ont été utilisés, la prémunition l'application d'organismes antagonistes à *verticillium* (**El Aissami, 1999**).

Bien que dans le cas de la *verticilliose*, la prémunition a donné des résultats parfois spectaculaires, son utilisation dans la pratique agricole reste difficile, le recours aux microorganismes antagonistes reste une voie plus prometteuse et qui connaît actuellement un grand développement

Durant ces dernières années et dans le but de mettre au point un procédé de lutte contre la *verticilliose* d'une manière économique et sans inconvénient pour l'environnement, les phytopathologistes ont isolé de la rhizosphère un grand nombre de champignons et de bactéries antagonistes au *verticillium* (El Aissani et Lahlou 1999).

Talaromyces flavus est parmi les microorganismes bénéfiques les plus utilisées dans bio protection des plantes contre *verticillium*.

I.10. Influence des facteurs abiotique sur la croissance, la sporulation et la pathogenicité des agents pathogènes telluriques :

1. Influence de ph

Le ph est un paramètre de grande importance pour le développement et la croissance du champignon *V.dahliae*. Il intervient surtout au niveau de la croissance mycélienne (Ramualde, 1992).

Des résultats similaires ont été obtenus chez l'espèce *V.dahliae* par ramualde ,1992 Thanassouloupoulos, kitosos (1972), Ligoxigakis et al. (2002) et Yildiz et al, (2009) ont montré que la croissance optimale chez le *V.dahliae* se situe à ph 4 par contre Goud et al (2003) ont rapporté que les deux espèces de *verticillium* (*V .dahliae* et *V.tricorpus*) peuvent se développer à un ph allant de 5 à 7, dont l'optimum est obtenu à ph 5 pour *V .dahliae* et à ph 6 pour *V.tricorpus*.

2. Influence de la température

Robert et Davidson (1986) ont rapporté que des isolats appartenant au genre *Verticillium* n'ont montré aucune croissance lorsqu'ils ont été incubés à 30°C .selon Nonnecke(1989), la température maximale de croissance chez les espèces de *verticillium dahliae* se situe au tour de 27°C.

Bhat et al (2003) ont comparé une gamme de température sur la croissance des isolats de *v.dahliae* obtenus à partir du poivron, piment et tomate .ces auteurs ont constaté que la température à une grande influence sur la croissance et la

développement du pathogène et que l'optimum est obtenu à des températures variant entre 20°C à 25°C.

Dans des études menées par Bejarano et al. (1996), Cirulli et al. (2010) mentionnent que *v.dahliae* présente une croissance optimale entre 24°C et 27°C et peut croître et infecter son hôte à 30°C.

Dans des études menées en Iran par **Sanei et al. (2008)**, ces derniers ont rapportés que les taux de croissance de *v.dahliae* dépendent de la température, dont l'optimale se situe entre 25°C et 27°C.

Shittu(2010) a montré que *v.albo-atrum* se développe généralement entre 20°C et 25°C, alors que *dahliae* nécessite des températures beaucoup plus élevées entre 25 à 28°C.

3. Influence de la salinité

La salinité est souvent réputée être responsable de l'attaque sévère des plantes par les champignons pathogènes du sol c'est le cas des trachéomycoses dû aux champignons du genre *verticillium* et *fusarium* qui sont aggravées par la salinité des sols, L'augmentation du chlorure de sodium dans le sol stimule le développement et la conservation des champignons vasculaires (**Besri ,1981 ; Afailal et al 1987**).

Plusieurs travaux ont rapporté que l'augmentation de la salinité du milieu favorise la croissance et la conservation de *verticillium dahliae* et de *fusarium oxysporum fsp lycopersia* principaux agents des trachéomycoses (**Besri, 1977, Ioanno, et al, 1977, Besri ,1981**)

Besri (1990) ET Besri et Afailal (1993) ont rapporté que la salinité des sols contribue à l'aggravation de la *verticilliose* de la tomate en augmentant la sensibilité de la plante à l'attaque par *verticillium dahliae*.

Nachmiai et al, (1993) ont étudié l'effet de la salinité et son interaction avec deux maladies de la pomme de terre le flétrissement dû à *verticillium dahliae* et le blight précocose causé par *Alternaria Solani* ces auteurs ont rapporté une hausse dans

l'expression des symptômes chez les plantes cultivées en milieu semi aride et arrosées avec des eaux à différent degrés de salinité.

Plusieurs agents pathogènes autres que *V.dahliae* étaient tolérants aux sels en culture, notamment *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* spp. **(Tresner et Hayes 1971)**

Pythium aphanidermatum **(Rasmussen et Stanghellini 1988)**, *Phytophthora* spp. **(Macdonald 1982, Blaker et Macdonald 1985)**, *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici **(Besri 1980;Daamiremadi et al 2009)** et *oxysporum .f sp Vasinfectum* **(Ragazzi et Vecchio 1992)**.

Le NaCl a eu les effets négatifs les plus importants sur le développement, la morphologie et la sclerotinisation de *Macrophomina phaseolina* en raison de la réduction de la synthèse de certains métabolites par cette espèce.

4.Influence de la lumière

Dans la nature, il est souvent difficile de cerner l'effet propre de la lumière et de l'obscurité sur le développement des espèces fongique. Par contre sur milieu gélose la lumière et surtout l'obscurité sont deux facteurs extrêmement important pour la sporulation et la croissance mycélienne du champignon **(Rapilly 1969)**.

I.11.Influence des facteurs abiotiques sur les activités biologiques des agents pathogènes telluriques

Dans le processus de pénétration des champignons pathogènes à travers la paroi cellulaire un rôle essentiel est joué par les enzymes hydrolysant les hémicelluloses et les celluloses ,De nombreux champignons phytopathogènes sont connus pour leur production d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides des parois cellulaires de leur plantes hôtes, les cellulase et les pectinase seraient impliquées dans les maladies des plantes et dans le processus de la dégradation des tissus durant la colonisation par l'agent pathogène **(Wood, 1960 ; Cooper et Wood ,1975)**.

La colonisation des tissus par le parasite est rendue aisée par la production d'enzymes de dégradation des parois cellulaires de l'hôte (Cooper et al ,1978 ; Durand &Cooper ,1988).Une corrélation positive existe entre l'activité des cellulases et des pectinase produites par des isolats de *verticillium* et leur agressivité vis-à-vis de leur plantes hôtes (Gupta & Heale, 1971, Durand &Cooper, 1988). En outre ce champignon est apte à produire des métabolites toxiques à l'intérieur des tissus infectés et qui seraient impliqués dans l'expression des symptômes de la maladie **(Nachmias et al ,1982 ; Meyer et al, 1994).**

Russuel(1975) a montré que l'infection des tomates avec *V.albo-atrum* entraîne une augmentation de l'activité cellulolytique aussi bien chez les plantes sensibles que résistante cet auteur stipule que les celluloses sont produite par les plantes mais aussi en grande partie par le pathogène.

V. albo-atrum produit une gamme de polysacchridases qui dégradent les parois cellulaires des tissus vasculaires de la tomate **(Cooper et al ; 1978, Cooper et Wood ; 1980, Durrand et Cooper ; 1988)**

Une augmentation de l'activité endopeptine lyase dans les vaisseaux conducteur des tomates sensible a été enregistrée 3jours après l'infection par *v.albo-atrum* et bien avant l'apparition de symptômes **(Cooper et Wood, 1980).**

Bateman 1969 a rapporté que l'environnement ou se développent certain champignons phytopathogènes influe sur le type et la quantité d'enzymes pectocellulosiques qu'ils produisent.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1.objectif de l'expérimentation :

Cette étude in vitro a été réalisée afin de caractériser et d'évaluer les effets de quelques facteurs environnementaux (Ph, NaCl, polyéthylène glycol) sur la croissance mycélienne pondérale, L'activité endo- β -1,4-glucanase, β -1,4 glucosidase et la quantité de protéines de *Verticillium sp.* Ces paramètres sont choisis par rapport à leurs étroites relations avec le pouvoir pathogène des 2isolats de ce champignon tellurique

Tableau 2 : origine des isolats de *Verticillium sp.*

Isolats de <i>Verticillium sp</i>	Région	Plante hôte
VX	Tébessa	Tomate
V124	Tlemcen	Tomate

II.2-Matériel fongique :

Les deux isolats de *verticillium dahliae* a été fourni par Mr.Degaichia du laboratoire de biotechnologies des productions Végétal de l'université de Blida 1 ils sont été isolés respectivement à partir de culture de tomate de la région de Tébessa (VDx) et de la région de Tlemcen(Vd124), présentant des symptômes de flétrissement et de brunissement au niveau des collets caractéristiques de la verticilliose.

Sur la base des observations des structures morphologique du champignon retrouvé sur le milieu de culture, et la clé de détermination de **Rieuf P(1985)**, il a été confirmé la présence de *Verticillium sp* par la production de microsclérotés, de conidiophores verticillés (Figure1). Ces souches ont été repiquées, purifiées et conservées à 25°C à l'obscurité sur milieu de culture PDA dont la composition est en (Annexe1)



A



B

Figure 8: (B) Aspect macroscopique et (A) microscopique (X400) du *Verticillium sp*

A: conidiophores et conidies ; (Degaichia, communication personnel)

II.3. Influence de quelques facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne et l'activité des enzymes cellulolytique produites in vitro par les deux isolats de *verticillium sp*

II.3.1. Influence du pH

Les cultures liquides sont réalisées dans des Tubes de 200 ml à raison de 100 ml par tubes à différents Ph (4, 6, 8,9) et (Figure II.2) Chaque ph est ajusté avec HCL (1N) ou NAOH (1N) à l'aide d'un pH mètre.

Les 2 isolats de *verticillium sp* sont cultivés en milieu liquide à base de Pomme de terre et autoclavé à 120°C pendant 20min

. Les cultures liquides à différents Ph sontensemencées avec 1 ml d'une suspension de spores à 10^6 spores /ml fraîchement préparée à partir d'une culture de *Verticillium sp* des 2 isolats âgées de 12 jours.

Les cultures ont été incubées sous agitation de 190 rpm à 25 °C et dans l'obscurité et pour chaque expérience 3 répétitions ont été effectuée pour chaque isolat et chaque pH.

II.3.2. Influence de NaCl

Les cultures liquides sont réalisées dans des Tubes de 200 ml à raison de 100 ml par tubes additionné de concentrations croissantes de NaCl (2,4 et 9g/l) (Agent stressant osmotique). Le pH est ajusté à 6,8 avec du HCL (1N) ou NAOH (1N) à l'aide d'un pH mètre.

Les 2 isolats de *Verticillium* sp sont cultivés en milieu liquide à base de Pomme de terre ; le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20min

Les cultures liquides à différents concentrations en NaCl sontensemencées avec 1 ml d'une suspension de spores à 10^6 spores /ml fraîchement préparée à partir d'une culture de *Verticillium* sp des 2 isolats âgées de 12 jours

Les cultures ont été incubées dans une chambre de culture dans l'obscurité sous agitation de 190 rpm à 25 °C (Figure 3)

Pour chaque expérience 3 répétitions ont été effectuée pour chaque isolat et chaque concentration en NaCl.



Figure 9: des tubes à essai contenant l'échantillon



Figure 10 : Incubation sous agitation de l'essai (Photo originale)

II.3.3. Influence du polyéthylène glycol

Les cultures liquides sont réalisées dans des Tubes de 200 ml à raison de 100 ml par tubes additionné de concentrations croissantes de PEG (agent stressant osmotique)(2,3,4 g/l). Le ph est ajusté avec HCL (1N) ou NAOH (1N) à l'aide d'un pH mètre.

Les 2 isolats de verticillium sp sont cultivés en milieu liquide à base de Pomme de terre ; le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20min

. Les cultures liquides à différents concentrations en PEG sontensemencées avec 1 ml d'une suspension de spores à 10^6 spores /ml fraîchement préparée à partir d'une culture de Verticillium sp des 2 isolats âgée de 12 jours.

Les cultures ont été incubées sous agitation de 190 rpm avec une température ambiante 25C° et à l'obscurité et pour chaque expérience 3 répétitions ont été effectuée pour chaque isolat et chaque dose de PEG.

II.3.4.Paramètres étudié

II.3.4.1. Effets des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne pondérale

Les cultures ont été incubées pendant 2 semaines sous agitation et les échantillons ont été collectés à la fin de l'expérimentation. Le mycélium a été séparé du milieu par filtration sous vide en utilisant une membrane millipore de 0,22 μ m de diamètre (Figure 4). Le mycélium obtenu à partir du milieu a été séché à 80°C pendant 10 min jusqu'au poids constant et pesé. Les résultats obtenus sont reportés en milligramme de matière sèche (mg MS), le poids sec du mycélium est ensuite déterminé.



Figure 11: Dispositif de filtration sous vide

II.3.4.2. Influence des facteurs abiotiques sur la quantité de protéines produites in vitro dans les filtrats de cultures des deux isolats de *verticillium sp*

La concentration totale en protéines contenu dans les échantillons, est déterminée par la technique mise au point par Bradford (1976). Cette technique utilise du bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule qui décale vers le bleu. L'intensité de la coloration sera fonction du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéines et non de la masse molaire de protéines

Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote de l'échantillon (100µl). Cette fraction est additionnée à la solution de Bradford (4ml) représentée par sa composition en(Annexe1). Le mélange est agité, puis mis au repos pendant 5 minutes pour stabiliser le complexe coloré formé. Ce complexe est la conséquence de la réaction du bleu brillant de Coomassie (BBC) G250 avec les protéines (Figure 2.4). La mesure effective des protéines est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre dans le visible à une longueur d'onde de 595nm. A cette longueur d'onde le blanc (H₂O distillée) et les échantillons de protéines sont lus alternativement pour s'assurer de l'absence d'interférences liées au solvant eau. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB) (Sigma-Aldrich) pour un domaine de concentration compris entre 0 et 0,8 g/l (Annexe 3). A partir de cette courbe d'étalonnage, on détermine systématiquement par extrapolation toutes les solutions inconnues en protéines exprimées en mg ou g/L. (Novo et al ,2006).

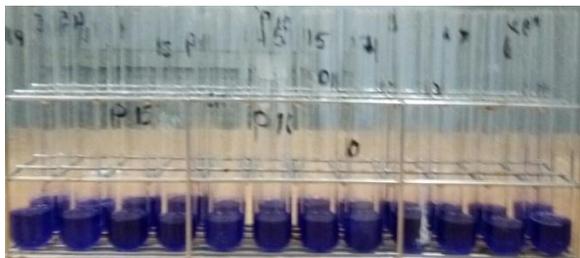


Figure 12 : Formation du complexe coloré entre le bleu brillant de Coomassie et les protéines.

II.3.4.3. Influence de facteurs abiotiques sur les activités enzymatiques de *Verticillium sp*

1-L'activité endo-B-1,4-glucanase

Elle a été mesurée par une augmentation du nombre de groupes réducteurs résultants de la libération de glucose par le CMC en utilisant les réactifs à l'arsénomolybdate de cuivre de Nelson, modifiés par Somogy (Nelson, N. 1944 et Somogy, M. 1952). Le mélange réactionnel contient 1,0ml de CMC à 1,5% dans 0,5ml de tampon acétate (pH 4,8) et 0,5ml d'échantillon. L'absorbance a été déterminée par spectrophotométrie à 540nm. Une courbe étalon de Glucose de concentration allant de 0 à 5 μ M a été établie (**Annexe 3**). L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mol /min de sucre réducteur exprimé en équivalent glucose. (**Novo et al ,2006**).

2-L'activité B-1,4 glucosidase

A été déterminée en mesurant le taux de p-nitrophényle libéré à partir de p-nitrophényle-B-D-glucopyranos

Le mélange réactionnel standard consistait en 1ml du milieu CZDM (Annexe1), 1,8ml de tampon acétate 0,1M (pH4, 8) et 0,2 ml d'échantillon .Après une incubation de 30min à 50°C

La réaction a été arrêtée avec un tampon à la tricine 0,4M (PH 10,8) et l'absorbance a été déterminée par spectrophotométrie à 420 nm.

Une courbe étalon de p-nitrophenyle de concentration allant de 0 à 250 μ M a été établie (**Annexe 3**). (**Novo et al ,2006**).

II.4. Analyse statistique des données

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS[®] version 20.0.0 pour Windows[™].

Les expériences ont été répétées trois fois et les résultats montrent les mêmes tendances.

Une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% est réalisée pour montrer l'existence de différences statistiquement significatives entre les différents facteurs environnementaux d'une part et les différents paramètres étudiés (Poids, teneur en Protéines, Activité Glucanase et Glucosidase) d'autre part. Ainsi un test post-hoc de Tukey pour faire ressortir les différents groupes homogènes

Un test de Corrélation (la corrélation de Pearson à 1% et 5%) pour voir l'association entre le poids, la teneur en Protéines, l'activité Glucanase et Glucosidase engendré par les différents facteurs abiotiques.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Détermination de la croissance mycélienne pondérale en fonction du pH du milieu

L'influence du pH du milieu sur la croissance des deux isolats de *Verticillium sp* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.1

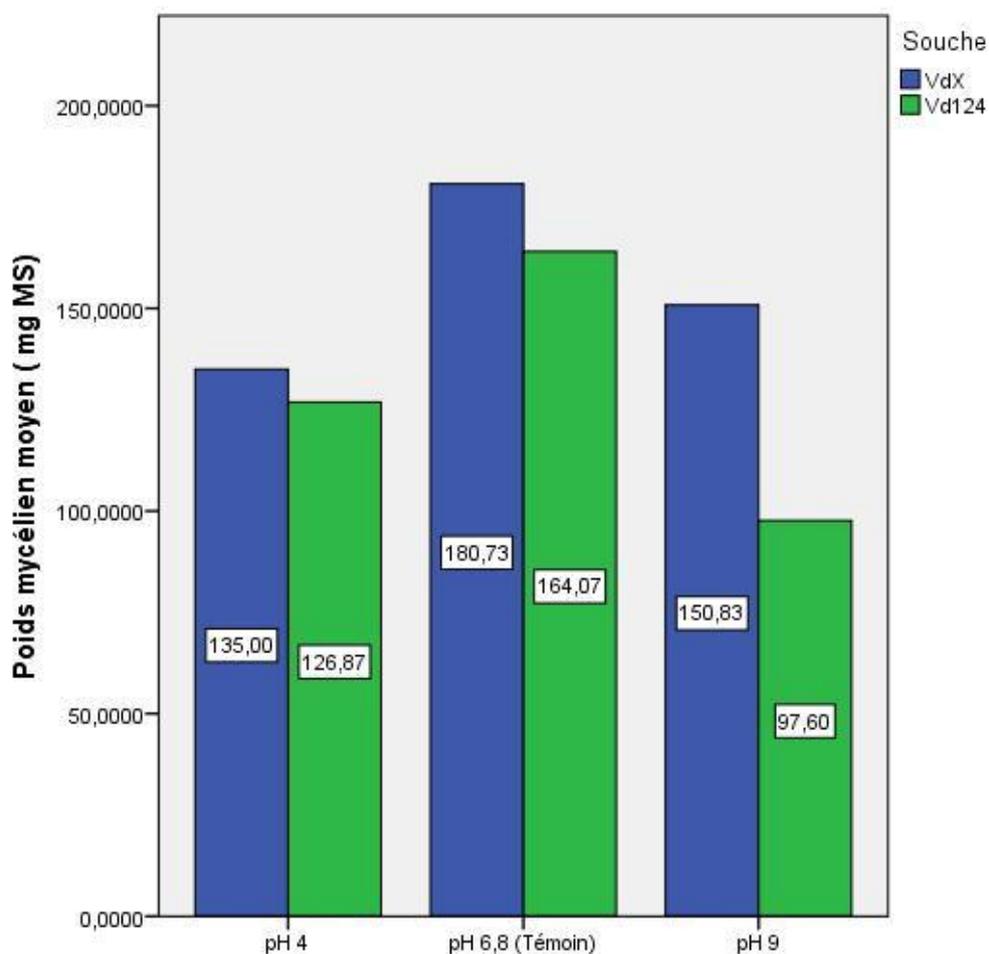


Figure III.1 : effet du pH du milieu sur la croissance mycélienne pondérale (mg Ms)

À un pH acide (pH=4) on note l'apparition d'un seul groupe homogène et que l'isolat Vx représente la valeur de croissance la plus élevée avec 135 mg Ms suivie par l'isolat V124 avec 126,87 mg Ms.

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux isolats de *Verticillium sp* ($p > 5\%$).

À un pH neutre (pH=6,8) qui est considéré comme un essai témoin on note également l'apparition d'un seul groupe homogène et que l'isolat Vx représente la valeur de croissance de l'ordre de 180,73mg Ms et chez l'isolat V124 164,07mg Ms qui représente la valeur de croissance la plus basse.

À pH basique (pH=9) on note d'après l'analyse statistique l'apparition d'un seul groupe homogène qui englobe les deux isolats Vx et V124

En sachant que L'isolat Vx enregistre également la valeur de croissance la plus élevée avec 150,83mg MS et chez l'isolat V124 97,60mg MS.

Le potentiel d'hydrogène (pH) du milieu à une influence notable sur la croissance mycélienne pondérale des deux isolats de *Verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3) où on relève ce qui suit :

La croissance mycélienne chez l'isolat Vx est plus élevée par rapport à la croissance mycélienne de l'isolat V124 en milieu neutre, acide et basique.

La croissance mycélienne chez l'isolat Vx en milieu neutre est statistiquement différente de celui du milieu basique et acide.

La croissance mycélienne chez l'isolat V124 en milieu neutre est statistiquement différente de celui du milieu basique et acide.

III.2. effet du pH sur la quantité de protéines produite in vitro dans les filtrats de culture des deux isolats de *Verticillium sp*

L'influence du pH sur la quantité de protéines produite in vitro dans les filtrats de culture de deux isolats de *verticillium* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.2

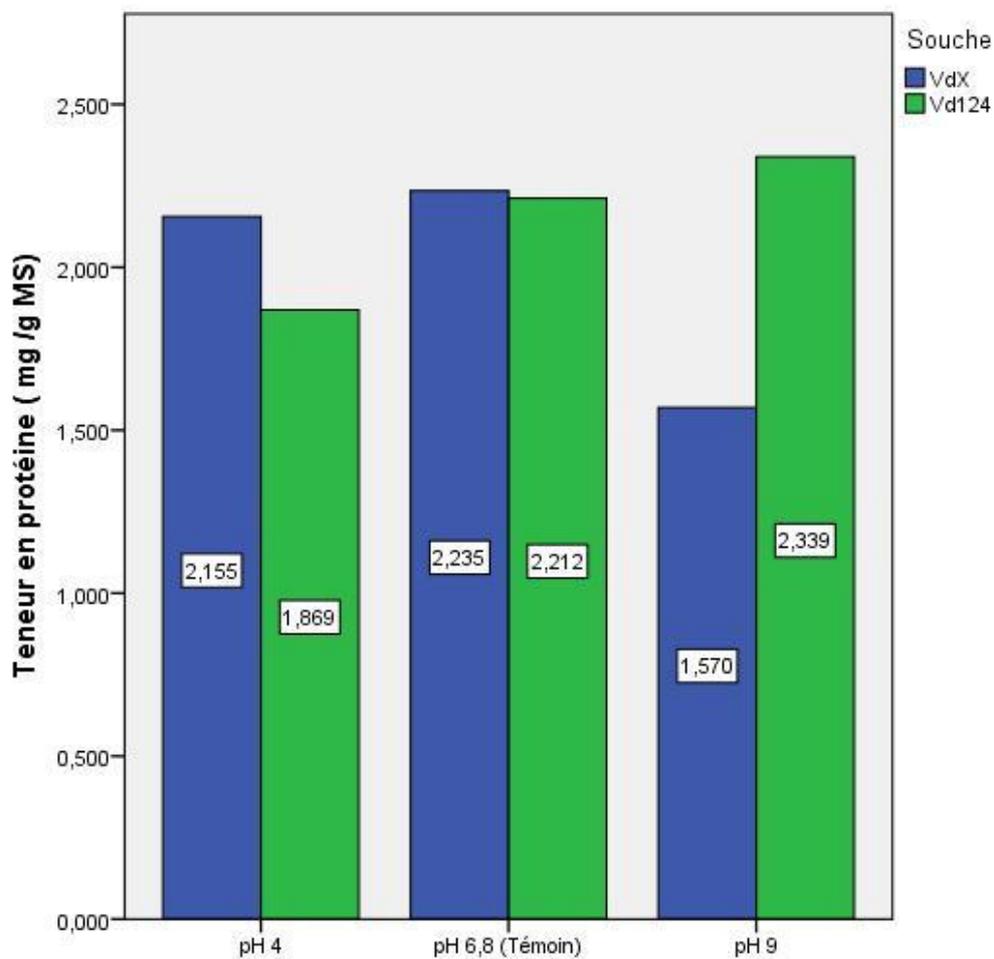


Figure III.2 effets du pH sur la teneur en protéines des deux isolats de *Verticillium sp* (mg \g Ms)

À un pH acide (pH=4) on note la présence d'un seul groupe homogène et que la quantité de protéines est plus élevée chez l'isolat Vx avec une valeur de 2,155 (mg) gMs) suivie par l'isolat V124 avec 1,869(mg) gMs).

À un pH neutre (pH=6,8) qui est considéré comme un essai témoin on note également que l'analyse fait ressortir un seul groupe homogène et que la teneur en protéines chez l'isolat Vx est de l'ordre de 2,235 (mg\ gMs) , l'isolat V124 enregistre la valeur la plus faible de 2,212(mg\ gMs) par rapport à l'isolat Vx.

À pH basique (pH=9) on note la présence d'un seul groupe en sachant que l'isolat V124 cette fois en milieu basique représente la valeur la plus élevée avec 2,339 (mg\ gMs) et l'isolat Vx avec une quantité de protéines de 1,570 (mg\ gMs).

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux isolats de *Verticillium sp* ($p>5\%$).

Le potentiel d'hydrogène (pH) du milieu à une influence notable sur la quantité de protéines produite in vitro des deux isolats de *Verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3) où on relève ce qui suit :

-La quantité de protéines produite in vitro chez l'isolat Vx en milieu neutre est statistiquement différente de celui du milieu basique et acide.

-La quantité de protéines produite in vitro chez l'isolat V124 en milieu neutre est différente de celui du milieu basique et neutre.

-La teneur en protéines chez l'isolat VX est plus élevée chez l'isolat V124 en milieu neutre et acide sauf en milieu basique où la quantité de protéines produite par l'isolat V124 qui est la plus élevée.

III.3. effet du pH sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase

L'influence du pH sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase des deux isolats de *Verticillium* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.3

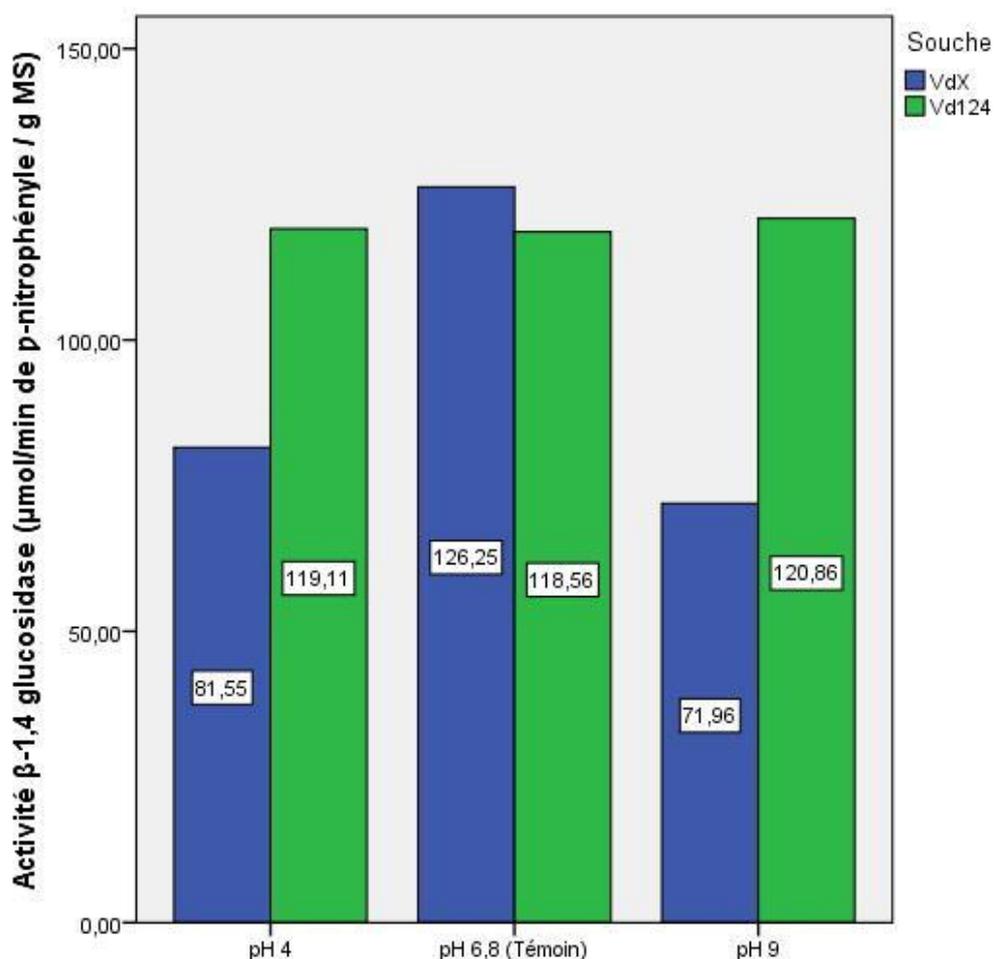


Figure III.3 : effets du pH sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du *Verticillium sp* ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS)

À un pH acide (pH=4) on note la présence d'un seul groupe homogène en sachant que l'isolat V124 représente la plus grande valeur de 119,11 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS) et l'isolat Vx avec 81,55 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS).

À un pH neutre (pH=6,8) on note que l'analyse fait ressortir deux groupes homogènes un premier regroupe l'isolat V124 avec une valeur de 118,56 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS) le second groupe englobe l'isolat Vx avec une valeur de 126,25 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS) qui représente la valeur la plus élevée.

À un pH basique (pH=9) on note également la présence d'un seul groupe qui englobe les deux isolats Vx et V124, l'isolat V124 enregistre la valeur la plus élevée de 120,86 ($\mu\text{mol}\backslash\text{min}$ de *D*-nitrophényle\g MS) et l'isolat Vx avec 71,96 ($\mu\text{mol}\backslash\text{min}$ de *D*-nitrophényle\g MS).

Le potentiel d'hydrogène (pH) du milieu à une influence notable sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase des deux isolats de *Verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3).

III.4. effet du pH sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase

L'influence du pH sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase des deux isolats de verticillium a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.4

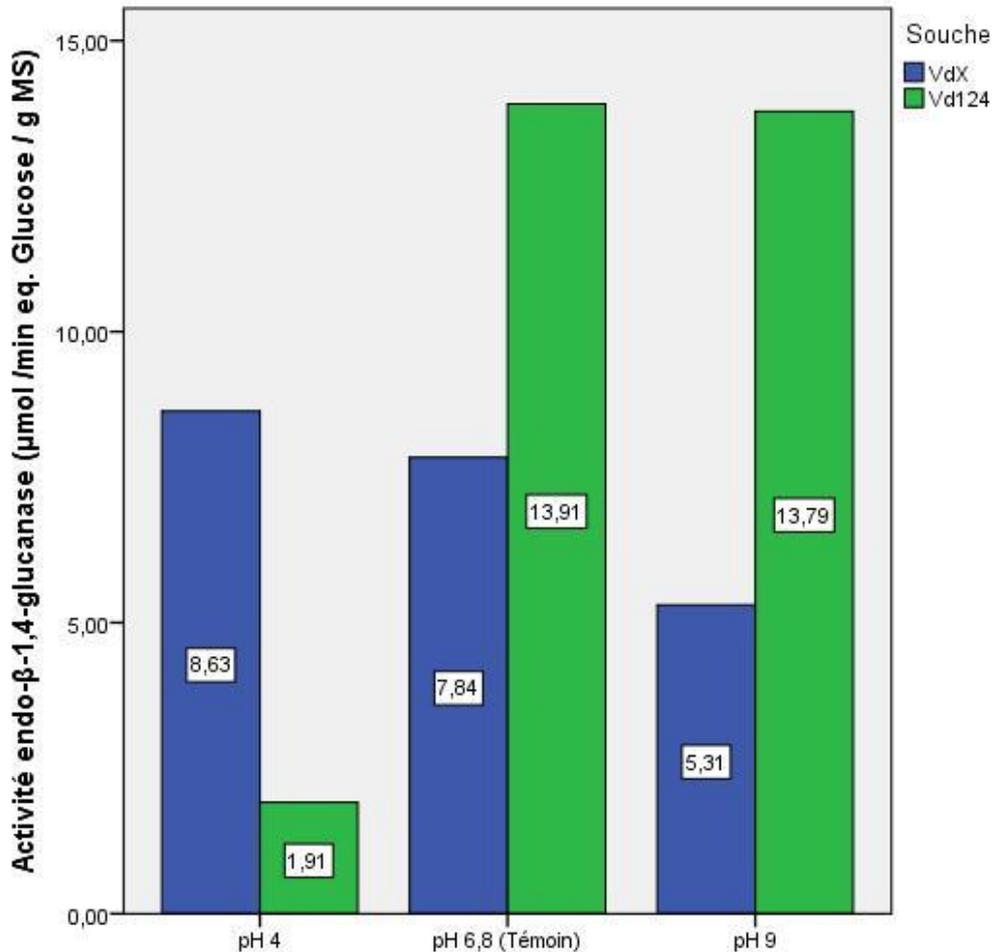


Figure III.4 : effets du pH sur L'activité enzymatique endo- B-1,4 glucanase du *Verticillium sp* (µmol|min eq.Glucose |g Ms).

À un pH acide (ph=4) on note d'après l'analyse statistique l'apparition d'un seul groupe homogène qui englobe les deux isolats Vx et V124, l'isolat Vx représente la valeur la plus élevée avec 8,63 (µmol|min eq.Glucose |g Ms) et l'isolat V124 qui représente la valeur la plus faible avec 1,91(µmol|min eq.Glucose |g Ms).

À un pH neutre (pH=6,8) où on note que l'analyse fait ressortir deux groupes homogènes, un premier regroupe l'isolat Vx avec une valeur de 7,84(µmol|min

eq.Glucose |g Ms) et l'isolat V124 est isolé dans le second groupe avec une valeur de 13,91($\mu\text{mol}|\text{min eq.Glucose |g Ms}$).

À un pH basique (pH=9) on note également l'apparition de deux groupes homogènes un premier qui regroupe l'isolat Vx dont la valeur est de l'ordre de 5,30($\mu\text{mol}|\text{min eq.Glucose |g Ms}$), l'isolat V124 est représenté dans un second groupe avec 13,78 ($\mu\text{mol}|\text{min eq.Glucose |g Ms}$).

La corrélation de Person au seuil de 1% et 5 % indique qu'il existe une corrélation significative ($p=0,00$) entre l'activité B-1,4 glucosidase et l'activité endo-B-1,4 glucanase.

III.5.Détermination de la croissance mycélienne pondérale en fonction de la concentration en sel du milieu

L'influence du NaCl sur la croissance de deux isolats de Verticillium a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.5

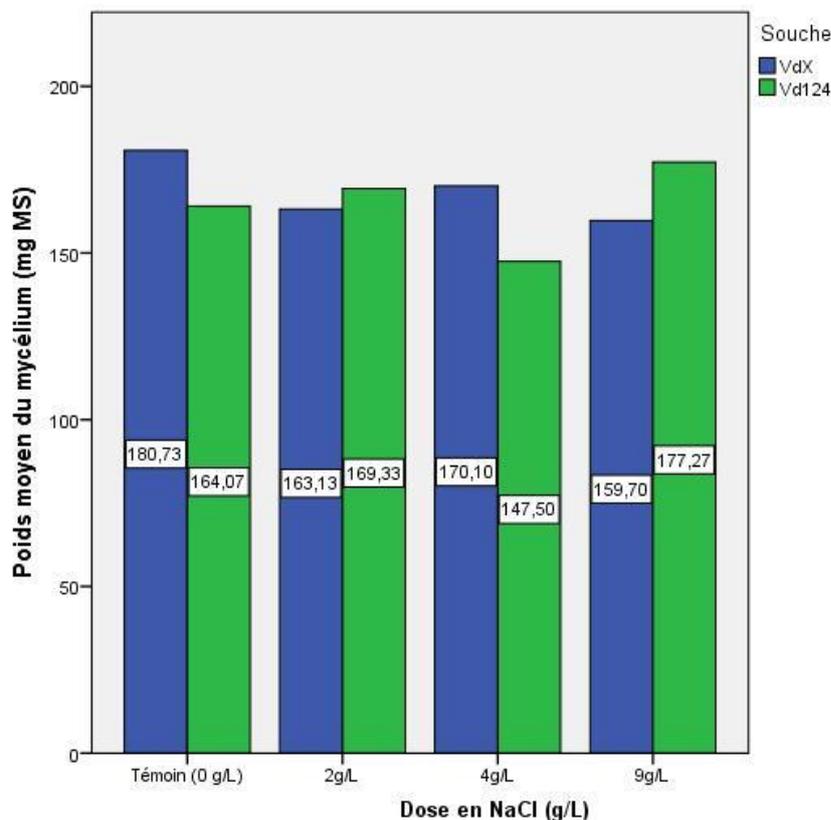


Figure III.5. : Effet du NaCl sur la croissance pondérale mycélienne du *Verticillium sp* (mg Ms).

À une concentration nulle en NaCl (témoin) on note l'apparition d'un seul groupe qui englobe les deux isolats, l'isolat Vx représente la plus grande valeur de croissance avec 180,73(mg Ms) et l'isolat V124 représente la valeur de croissance la plus faible avec 164,06 (mg Ms).

L'application d'une dose de 4g\L de NaCl fait ressortir un seul groupe on note également que l'isolat Vx représente la plus grande valeur de croissance de l'ordre de 170,10 (mg Ms) suivie par l'isolat V124 avec 147,50(mg Ms).

L'application d'une dose de 9g\L on note également un seul groupe homogène qui englobe les deux isolats Vx et V124, l'isolat V124 représente également la valeur de croissance la plus élevée avec 177,27(mg Ms) et l'isolat Vx avec 159,70(mg Ms).

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux isolats de *Verticillium sp* ($p>5\%$).

La concentration en sel du milieu à une influence notable sur la croissance mycélienne pondérale des deux isolats de *Verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3).

III.6. effet de NaCl sur la quantité de protéines produite in vitro dans les filtrats de culture des deux isolats de *Verticillium sp*

L'influence de NaCl sur la quantité de protéines produite in vitro dans les filtrats de culture de deux isolats de *verticillium* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.6

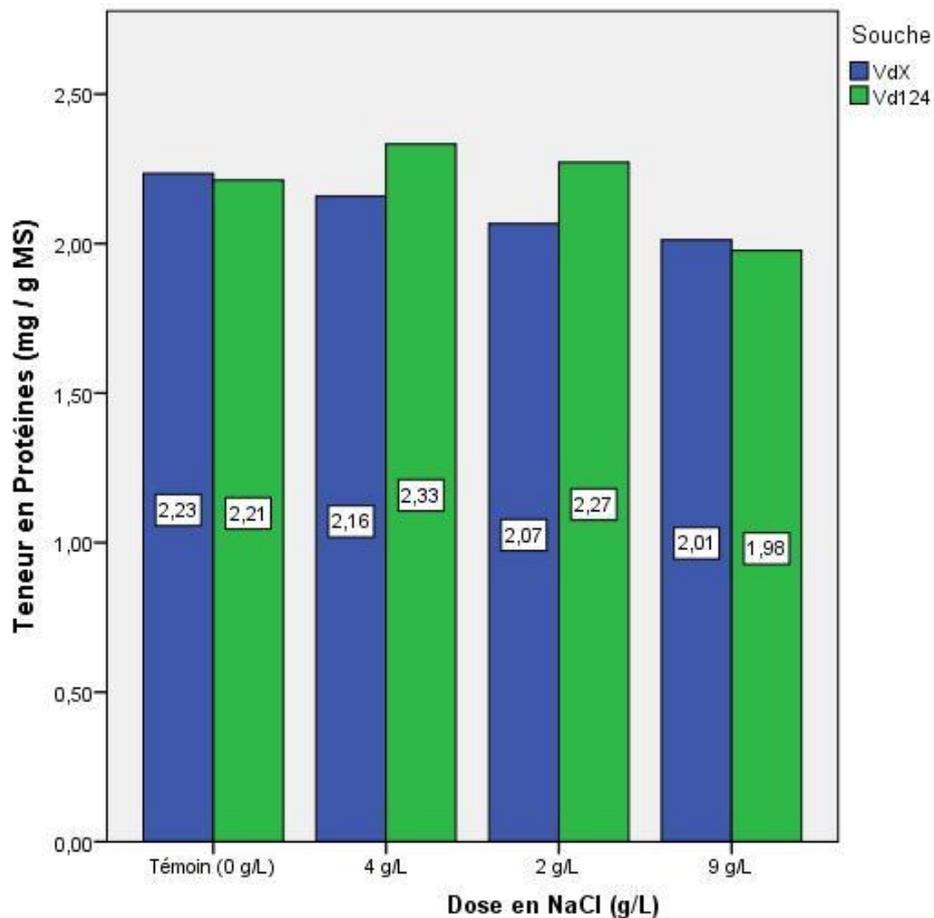


Figure III.6 : effets de NaCl sur la teneur en protéines des deux isolats de *Verticillium sp* (mg \g Ms)

A une concentration nulle en NaCl (témoin) on note l'apparition d'un seul groupe qui englobe les deux isolats Vx et V124, d'après l'analyse statistique la teneur en protéines des deux isolats est a peu près similaire chez l'isolat Vx est de 2,23(mg \g Ms) et chez l'isolat V124 est de 2,21(mg \g Ms).

L'application d'une dose de 2g/L fait que la teneur en protéines est plus élevée chez l'isolat V124 avec une valeur de 2,27(mg \g Ms) et l'isolat Vx avec une valeur de 2,07(mg \g Ms).

L'application d'une dose de 4g/L fait ressortir également un seul groupe et la teneur en protéines est plus élevée chez l'isolat V124 avec 2,33 (mg \g Ms) suivie par l'isolat Vx avec 2,16(mg \g Ms).

L'application d'une dose de 9g/L fait que la teneur en protéines chez l'isolat Vx est plus élevée Vx=2,01 (mg \g Ms) et pour l'isolat V124 la teneur en protéines est de l'ordre de 1,98(mg \g Ms).

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux isolats de *verticillium sp* ($p>5\%$).

La concentration en sel du milieu à une influence notable sur la quantité de protéines produite des deux isolats de *verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3).

III.7. effet de NaCl sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase

L'influence de NaCl sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase des deux isolats de verticillium a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.7

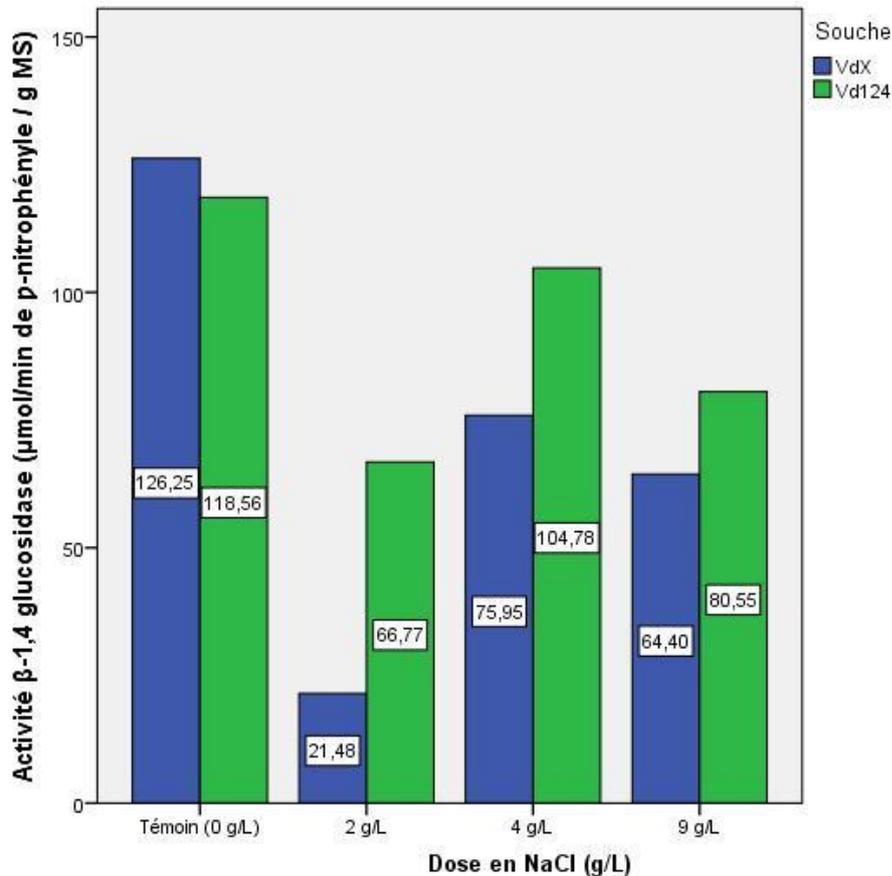


Figure III.7 : effet de NaCl sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du *verticillium sp* (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS).

À une concentration nulle en NaCl (témoin) on note l'apparition de 3 groupes homogènes le second groupe regroupe l'isolat V124 dont la valeur est 118,56 (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS) le troisième groupe est représenté par l'isolat Vx avec une valeur de 126,25 (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS).

L'application d'une dose de 2g\l on note l'apparition d'un seul groupe homogène est on remarque que la valeur est également plus élevée chez l'isolat V124 par rapport à l'isolat Vx avec une valeur de 21,48 (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS).

L'application d'une dose de 4g/L fait ressortir 2 groupes homogènes qui englobent les 2 isolats Vx et V124 L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase est plus élevée chez l'isolat V124 avec une valeur de 104,78 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS), l'isolat Vx représente la valeur la plus basse avec 75,95($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS).

D'après l'analyse statistique qu'à une concentration de 9g/L on note l'apparition de 2 groupes homogène qui englobent les deux isolats Vx et V124, pour l'isolat Vx 64,40($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS), et pour l'isolat V124 on note 80,55($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS),

La concentration en sel du milieu à une influence notable sur la quantité sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase des deux isolats de *verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3).

La corrélation de Person au seuil de 1% et 5 % indique qu'il existe une corrélation significative ($p=0,00$) entre l'activité B-1,4 glucosidase et l'activité endo-B-1,4 glucanase.

III.8. effet de NaCl du milieu sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase

L'influence de NaCl sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase des deux isolats de *verticillium sp* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.8

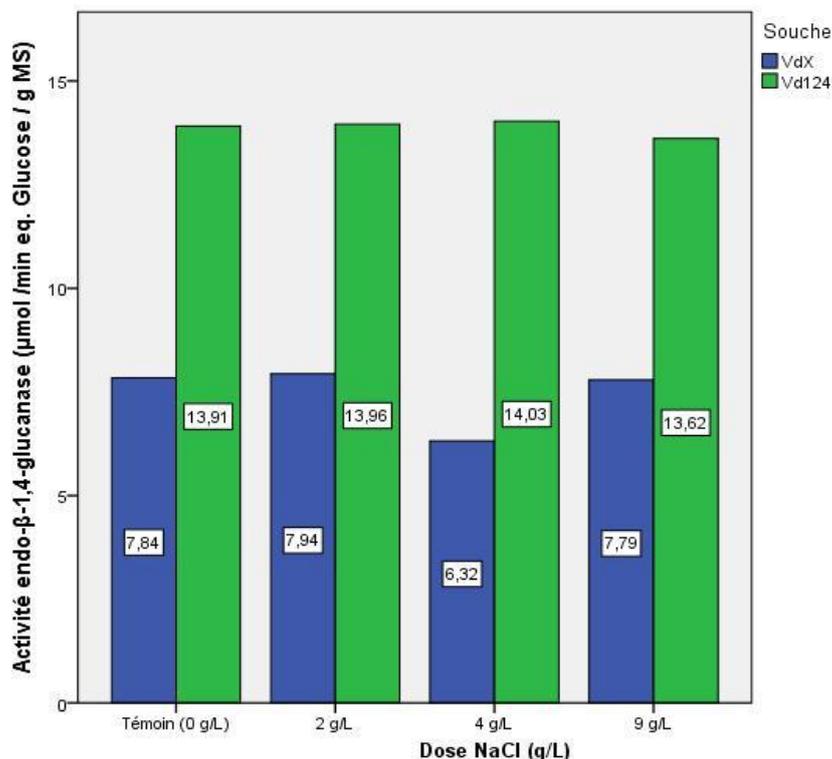


Figure III .8 : effet de NaCl du milieu sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase *Verticillium sp* ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$).

A une concentration nulle on note l'apparition d'un seul groupe homogène qui regroupe les deux isolats V124 et Vx, L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase est plus élevée chez l'isolat V124 que celle de l'isolat VX, l'isolat V124 enregistre une valeur de 13.91 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$) et l'isolat Vx avec 7,84 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$).

L'application d'une dose de 2g\L d'après l'analyse statistique on note également l'apparition d'un seul groupe qui regroupe les deux isolats L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase est également plus élevée chez l'isolat V124 avec une valeur de 13.96 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$), l'isolat Vx représente la valeur la plus faible avec 7,94 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$).

L'application d'une dose de 4g\L on remarque également d'après l'analyse statistique l'apparition d'un seul groupe homogène et que L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase chez l'isolat V124 est plus élevée que celle de l'isolat Vx.

L'application d'une dose de 9g\L fait ressortir un seul groupe homogène qui regroupe les deux isolats L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase chez l'isolat V124 est également plus élevée que celle de l'isolat Vx.

La corrélation de Person au seuil de 1% indique qu'il existe une corrélation significative et inversement proportionnelle entre L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase et L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase.

III.9. Effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale

L'influence du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale des deux isolats de *verticillium sp* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.9

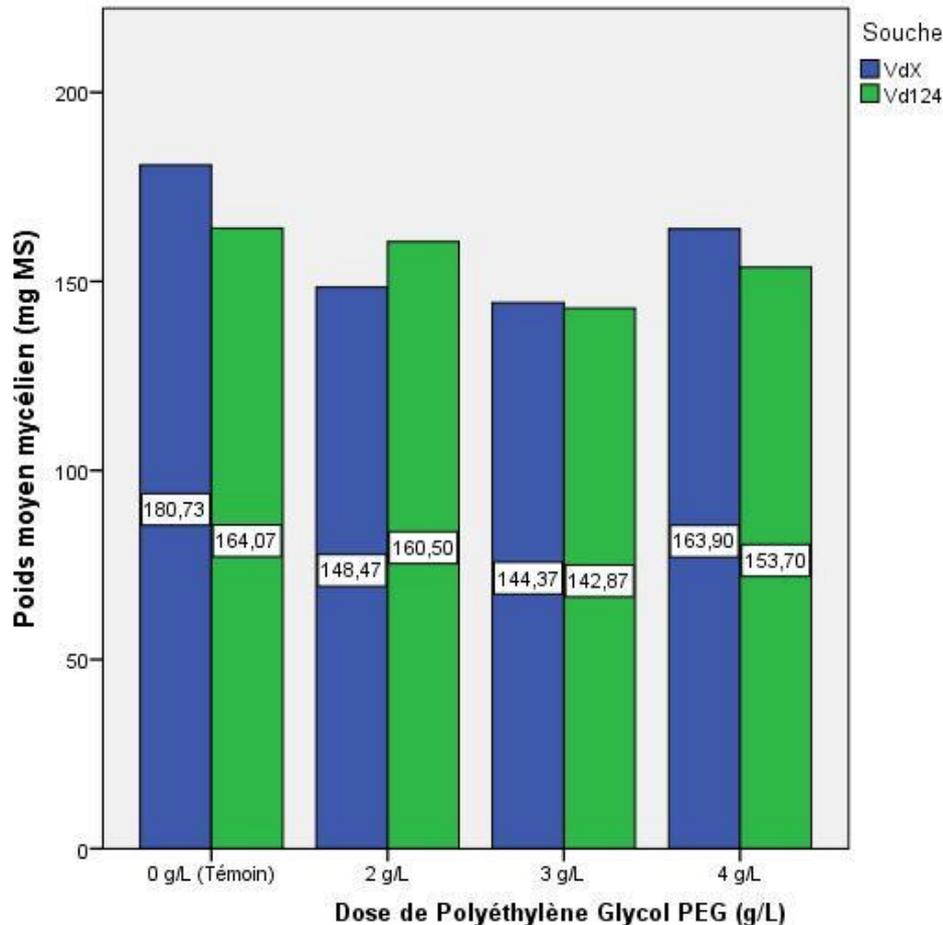


Figure III.9 : Effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale du *verticillium sp* (mg MS)

À une concentration nulle en PEG (témoin) on note l'apparition d'un seul groupe qui englobe les deux isolats, la croissance mycélienne chez l'isolat Vx est plus élevée que celle de l'isolat V124 avec 180,73 (mg MS), l'isolat V124 représente la valeur la plus faible avec 164,07 (mg MS).

L'application d'une dose de 2g/L on note également l'apparition d'un seul groupe qui regroupe les deux isolats cette fois la croissance mycélienne est plus élevée chez

l'isolat V124 avec une valeur de l'ordre de 160,50 (mg MS), l'isolat Vx enregistre une valeur de 148,47 (mg MS).

On note d'après l'analyse statistique, qu'à une concentration de 3g/L la croissance mycélienne est plus élevée chez l'isolat Vx avec une valeur de 144,37 (mg MS), suivie par l'isolat V124 avec une valeur de croissance de 142,87(mg MS).

L'application d'une dose de 4g/L fait également que la croissance mycélienne chez l'isolat Vx est plus élevée que celle de l'isolat Vx.

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux isolats de *Verticillium sp* ($p > 5\%$).

III.10. effet du polyéthylène glycol sur la quantité de protéines produite in vitro dans les filtrats de culture des deux isolats de *Verticillium sp*

L'influence du pH sur la quantité de protéines produite in vitro de deux isolats de dans les filtrats de culture du *Verticillium* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.10

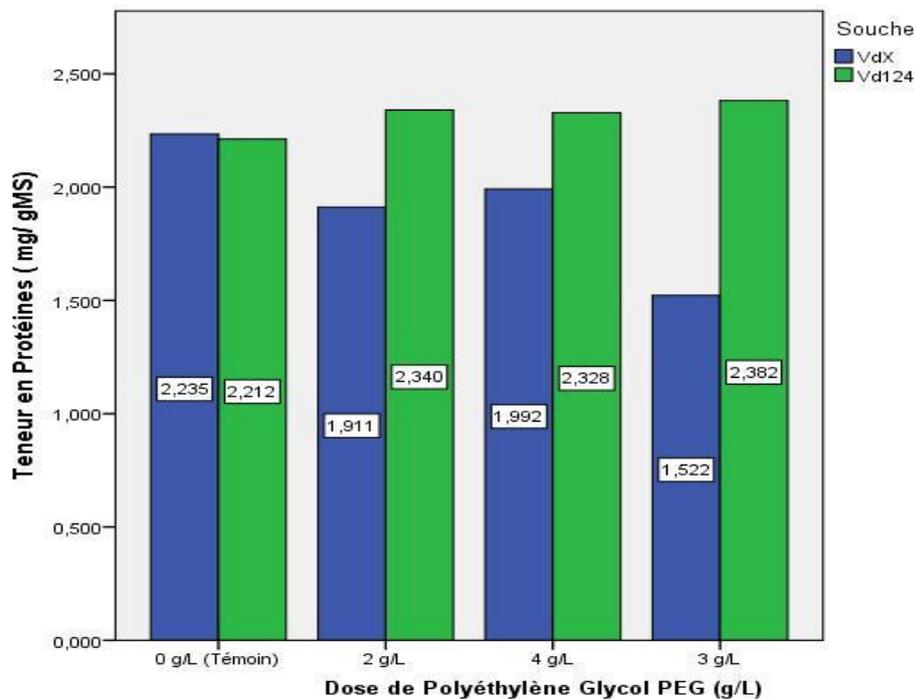


Figure III.10: effet du PEG sur la quantité de protéines produite in vitro des deux isolats de *verticillium sp* (mg \g Ms)

À une concentration nulle en PEG (témoin) on note l'apparition d'un seul groupe qui englobe les deux isolats, la croissance mycélienne chez l'isolat Vx et V124 ont une croissance similaire.

L'application d'une dose de 2g/L d'après l'analyse fait ressortir un seul groupe, la teneur en protéine est plus élevée chez l'isolat V124 avec une valeur de 2,340, (mg \ g Ms) l'isolat Vx enregistre une valeur de 1,911 (mg \ g Ms).

On note d'après l'analyse statistique, qu'à une concentration de 3g/L la teneur en protéine est plus élevée chez l'isolat V124 avec une valeur de 2,382 (mg \ g Ms) suivie par l'isolat Vx avec une valeur de 1,522 (mg \ g Ms).

L'application d'une dose de 4g/L fait également que la quantité de protéines produite chez l'isolat V124 est plus élevée que celle de l'isolat Vx.

Le polyéthylène glycol à une influence notable sur la quantité de protéines produite in vitro des deux isolats de *verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3).

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux isolats de *Verticillium sp* ($p > 5\%$).

III.11. effet du polyéthylène glycol sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase

L'influence du PEG sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase des deux isolats de verticillium a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.11

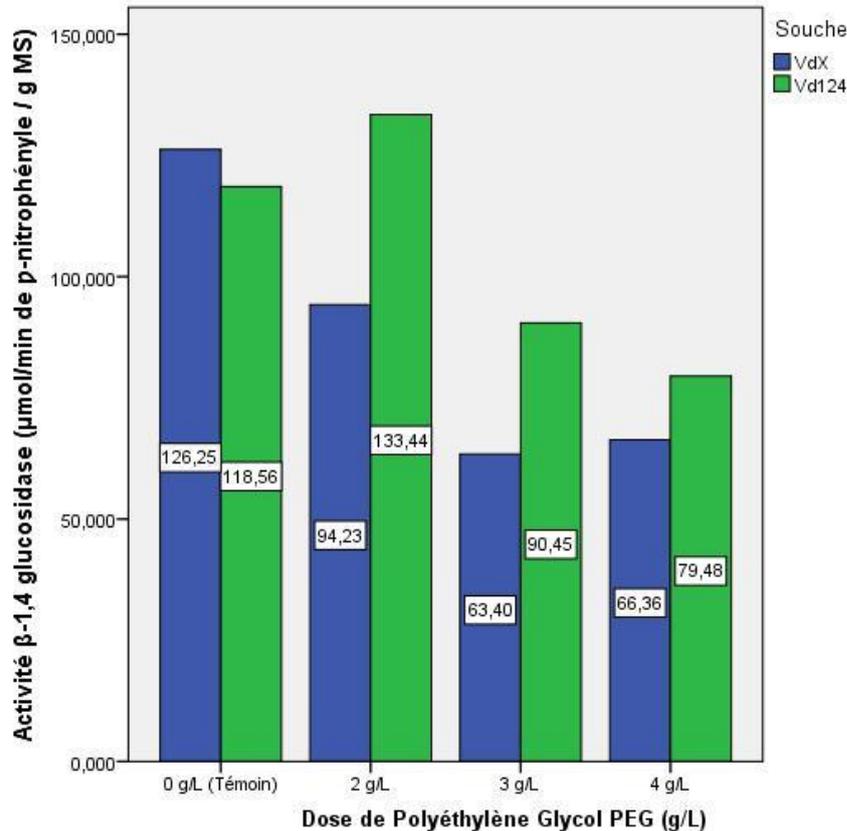


Figure III.11 effet du polyéthylène glycol sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du *Verticillium sp* (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS).

À une concentration nulle en PEG (témoin) on note l'apparition de trois groupes homogènes, le second groupe regroupe l'isolat Vx, le troisième englobe l'isolat V124 L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase chez l'isolat Vx est plus élevée avec une valeur de 126,25 (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS), l'isolat V124 enregistre une valeur de 118,56 (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS)

L'application d'une dose de 2g/L d'après l'analyse fait ressortir également trois groupes homogènes, l'isolat Vx est regroupé dans le deuxième groupe avec une valeur de 94,23 (μmol\min de *D*-nitrophényle\g MS) et l'isolat V124 est regroupé

dans le troisième groupe avec une valeur de 133,44 ($\mu\text{mol}\backslash\text{min}$ de *D*-nitrophényle\g MS).

On note d'après l'analyse statistique, qu'à une concentration de 3g\L on note l'apparition de deux groupes homogènes le premier regroupe l'isolat Vx et le second regroupe l'isolat V124, L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase chez l'isolat Vx est faible avec une valeur de 63,40 ($\mu\text{mol}\backslash\text{min}$ de *D*-nitrophényle\g MS), et pour l'isolat V124 enregistre une valeur plus élevée de 90 ,45($\mu\text{mol}\backslash\text{min}$ de *D*-nitrophényle\g MS).

L'application d'une dose de 4g\L fait ressortir un seul groupe, L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase chez l'isolat Vx et également faible par rapport à l'isolat V124.

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il existe une différence statistiquement significatives entre les deux isolats de *verticillium sp* ($p>5\%$).

Le polyéthylène glycol à une influence notable sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase des deux isolats de *Verticillium sp* étudiées ceci est démontré par le test MANOVA (annexe 3).

III.12. effet du PEG sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase

L'influence de PEG sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase des deux isolats de *Verticillium sp* a été étudiée et les résultats sont illustrés en moyenne dans la figure III.12

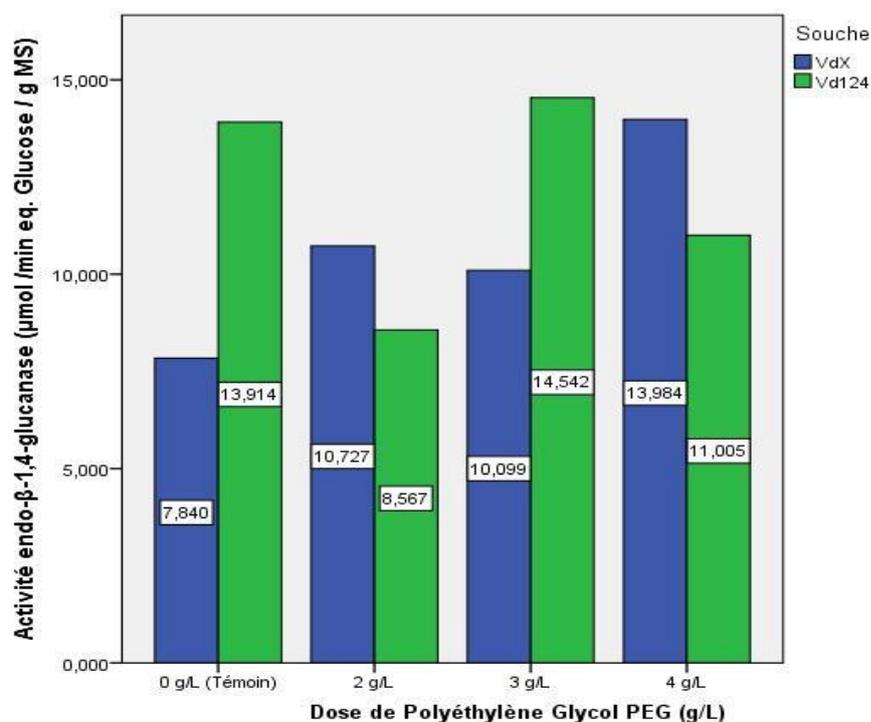


Figure III.12 : effet du PEG sur L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase du *Verticillium sp* (μmol|min eq.Glucose |g Ms).

À une concentration nulle en PEG (témoin) on note l'apparition de trois groupes homogènes le premier groupe englobe l'isolat Vx dont L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase est faible avec une valeur de 7,84 (μmol|min eq.Glucose |g Ms), le troisième regroupe l'isolat V124 avec une activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase élevée 13,91(μmol|min eq.Glucose |g Ms).

L'application d'une dose de 2g\L d'après l'analyse fait ressortir 2 groupes homogènes le premier regroupe l'isolat V124 dont enzymatique endo-B-1,4 glucanase est faible par rapport à l'isolat Vx avec une valeur de 8,567 (μmol|min eq.Glucose |g Ms).

Le second groupe englobe l'isolat Vx dont l'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase est plus élevée avec une valeur de 10,727(μmol|min eq.Glucose |g Ms).

L'application d'une dose de 4g/L fait ressortir également 2 groupes qui englobent les 2 isolats Vx et V124, l'activité enzymatique endo-B-1,4 est également plus élevée chez l'isolat Vx que celle de l'isolat V124

On note d'après l'analyse statistique, qu'à une concentration de 3g/L on note l'apparition de 3 groupes homogènes le premier regroupe l'isolat Vx dont l'activité enzymatique endo-B-1,4 est plus élevée avec une valeur de 10,099 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$), le troisième regroupe l'isolat V124 avec une de 14,54 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose /g Ms}$).

L'analyse de variance multivariée MANOVA indique qu'il existe une différence statistiquement significatives entre les deux isolats de *verticillium sp* ($p > 5\%$)

III.13- Effet des traitements sur la corrélation des paramètres étudiés

La corrélation est une quantification de la relation linéaire entre des variables continues (Figure 3.13). Le calcul du coefficient de corrélation de Pearson repose sur le calcul de la covariance entre deux variables continues. Le coefficient de corrélation est en fait la standardisation de la covariance. Cette standardisation permet d'obtenir une valeur qui variera toujours entre -1 et +1, peu importe l'échelle de mesure des variables mises en relation. Les tableaux des corrélations dont la synthèse des résultats cités ci-dessous sont consignés en Annexe 2

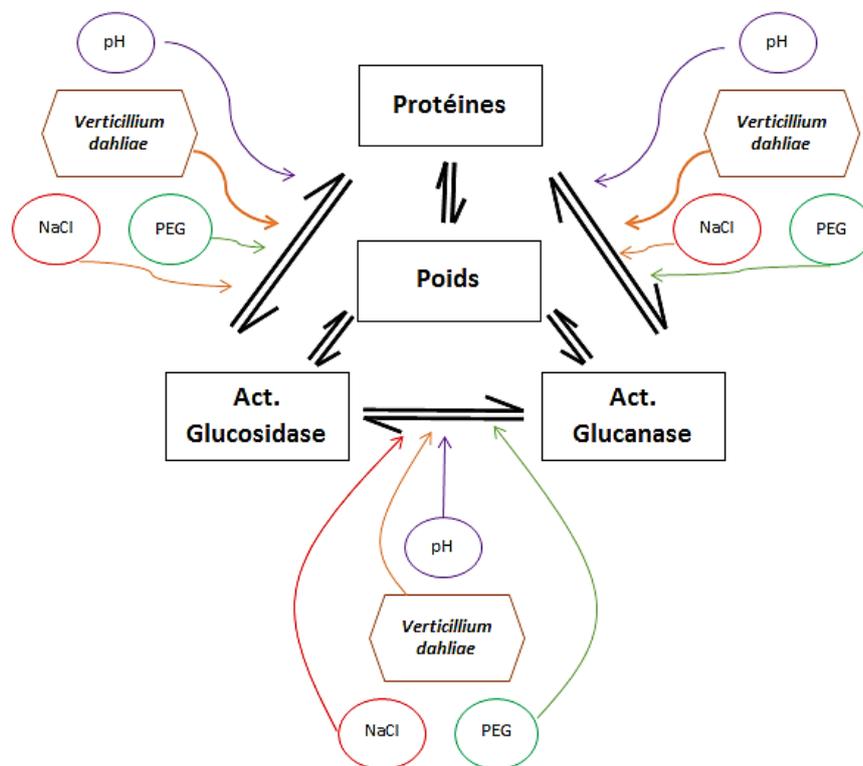


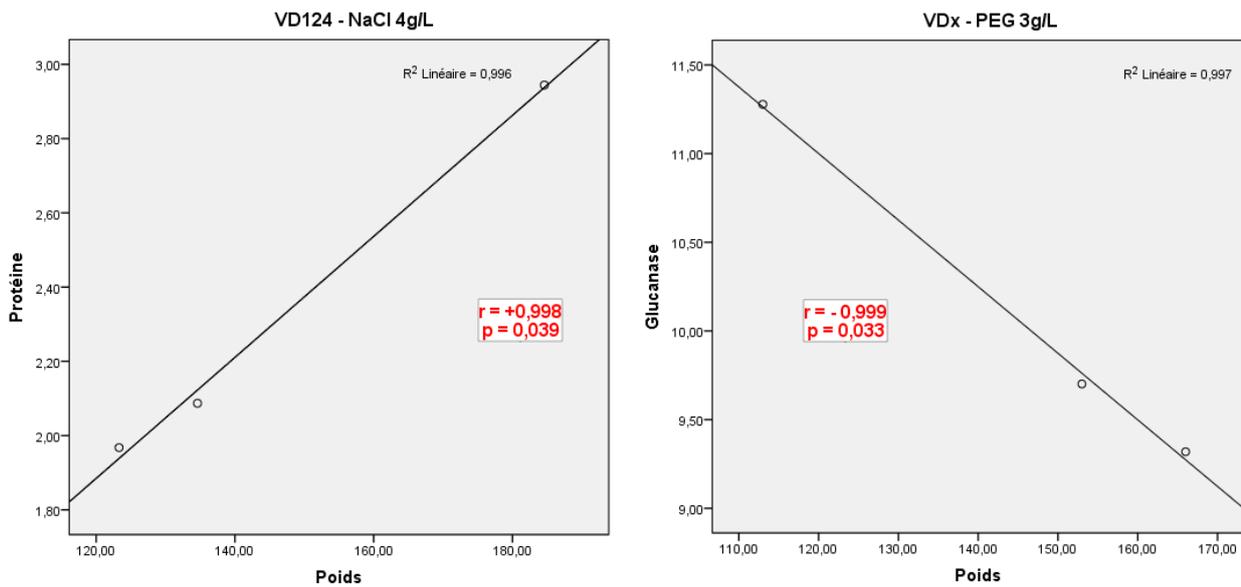
Figure III.13 : Représentation schématique de l'influence des facteurs de l'expérimentation sur les paramètres de l'étude

Dans les conditions standards de l'expérimentation (Témoin) nous n'observons aucune corrélation entre les paramètres étudiés (teneur en protéine, activité Glucanase/activité Glucosidase). Il va de même pour le pH, où on ne constate aucune corrélation notable entre les éléments de l'expérimentation.

L'application d'un stress salin par le Chlorure de sodium (NaCl) à raison de 4 g/L engendre l'apparition d'une corrélation proportionnelle de très forte intensité (presque

parfaite) entre la teneur en protéine et le poids mycélien de l'isolat VD124 ($r = +0,998$) (Figure 3.13A).

Le stress hydrique par l'apport de 3g/L de Polyéthylène Glycol (PEG) fait apparaître une corrélation inversement proportionnelle de très forte intensité (presque parfaite) entre l'activité Glucanase et le poids de l'isolat VDx ($r = +0,999$)



(Figure 3.13B).

Figure III.13 : Effet du stress salin et hydrique sur la Corrélation entre les paramètres étudiés

III.5.Discussion :

Les affections cryptogamiques sont redoutables et affectent une gamme très large de plantes, qu'elles soient cultivées ou spontanées .le genre *verticillium* regroupe deux espèces pathogènes de plantes (*V.dahliae* et *V .albo-atrum*) (Yildiz et al ,2009).le champignon responsable de la verticilliose (*Verticillium dahliae*) se conserve dans le sol sous forme de microsclérotés pendant de nombreuses années (jusqu'à 14 ans). Plusieurs facteurs abiotiques et biotiques stimulent la germination des microsclérotés (Terresinovia, 2017).

Les facteurs abiotiques sont essentiels à la croissance et au développement des champignons telluriques et peuvent avoir aussi des effets néfastes sur le développement de certaines maladies fongiques.

L'impact de ces facteurs sur la croissance mycélienne pondérale et les activités biologiques in vitro de deux isolats de *Verticillium sp* a été étudié dans ce travail.les isolats étudiés proviennent de la culture de tomate et de la région de Tébessa et de Tlemcen.

III.5.1.Effet du pH sur la croissance mycélienne pondérale et la quantité de protéines produites et l'activité enzymatique in vitro

Le ph est un paramètre de grande importance pour le développement et la croissance du champignon, En effet c'est l'un des principaux facteurs qui détermine l'agressivité et la virulence de l'agent pathogène. (Ramualde, 1992 ; Djabnoun ,2010).

Les résultats de l'effet du Ph sur la croissance et les quantités de protéines produite in vitro de deux isolat de *verticillium sp* sont représentés par les figures .la croissance des deux isolats est plus ou moins favorable à l'ensemble des pH, on remarque une réduction de la croissance pondérale du mycélium en milieu acide et basique. Les résultats montrent que l'optimum de croissance pour l'ensemble des isolats est situé à pH 4 après une incubation de 14jours sur milieu liquide.

Les variations du pH à des effets notables sur la quantité de protéines produites

Des résultats similaires ont été obtenus chez l'espèce *v.dahliae* par ramualde ,1992 Thanassouloupoulos, kitosos (1972), Ligoxigakis et al. (2002) et Yildiz et al, (2009)

ont montré que la croissance optimale chez le *v.dahliae* se situe à pH 4 par contre **Goud et al (2003)** ont rapporté que les deux espèces de *verticillium* (*v.dahliae* et *v.tricorpus*) peuvent se développer à un pH allant de 5 à 7, dont l'optimum est obtenu à pH 5 pour *v.dahliae* et à pH 6 pour *v.tricorpus*

Le rôle des enzymes cellulolytiques dans la détermination de l'agressivité des isolats de *verticillium* a fait l'objet de plusieurs études (Mussuel, 1973 ; Russuel, 1975 ; Regragui et al 2003), Nos résultats sur l'activité enzymatique du *Verticillium sp* montrent une augmentation de l'activité enzymatique B-1,4 endo-glucosidase sauf pour l'isolat Vx où on remarque une diminution de l'activité enzymatique en milieu acide et basique. Notons toutefois que l'activité enzymatique B-1,4 glucosidase de l'isolat pathogène V124 est supérieure à celle de l'isolat pathogène Vx en milieu acide et basique, le pH du milieu semble donc stimuler la production d'enzyme in vitro chez les deux isolats de *verticillium*. On note aussi une diminution de l'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase chez les deux isolats de *Verticillium sp* en milieu acide (pH=4), l'isolat V124 semble plus efficace pour la production d'enzyme dans nos conditions expérimentales.

III.5.2. Effet de NaCl sur la croissance mycélienne pondérale et sur la quantité de protéines produites et l'activité enzymatique

Les résultats de l'effet de NaCl sur la croissance et la quantité de protéines produites in vitro de deux isolats de *verticillium sp* sont représentés par les figures, Nos résultats ont montré que les niveaux de salinité testés (2g/L, 4g/L, 9g/L) n'avaient pas d'effet négatif sur la croissance mycélienne pondérale et la quantité de protéines produites nous observons une diminution de la quantité de protéines produites à 9g/L et une stimulation de la croissance mycélienne pondérale.

Plusieurs agents pathogènes autres que *V.dahliae* étaient tolérants aux sels en culture, notamment *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium spp.* (**Tresner et Hayes 1971**)

Pythium aphanidermatum (**Rasmussen et Stanghellini 1988**), *Phytophthora spp.* (**Macdonald 1982, Blaker et Macdonald 1985**), *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (**Besri 1980; Daamiremedi et al 2009**) et *oxysporum f.sp Vasinfectum* (**Ragazzi et Vecchio 1992**).

Le NaCl a eu les effets négatifs les plus importants sur le développement, la morphologie et la sclerotinisation de *Macrophomina phaseolina* en raison de la réduction de la synthèse de certains métabolites par cette espèce.

des études in vitro sur l'interaction salinité et *V.dahliae*, ont montré des effets non significatifs des traitements à des taux élevés en sel sur la sporulation des agents pathogènes et sur la formation des structures de résistances comme les microsclérotés, l'interaction des agents pathogènes avec la salinité semble être assez spécifique, complexe et ne peut être extrapolée pour tous les champignons du sol même s'il occupent la même niche écologique et subissent le même stress abiotique (Daami Remadi et al ,2009) .

Besri (1990) ET Besri et Afailal (1993) ont rapporté que la salinité des sols contribue à l'aggravation de la *verticilliose* de la tomate en augmentant la sensibilité de la plante à l'attaque par *verticillium dahliae*.

Les études de l'interaction salinité et *V.dahliae* sur tomate *Ventura* a montré que les plantes inoculées avec *V.dahliae* et arrosées avec des concentrations accrues d'eau salée étaient gravement affectées par la maladie. (Besri ,1990 ; Livescu et al ,1990 et Nachmias et al 1993). La salinité du sol augmente également la sensibilité de certaines cultures aux champignons tellurique tels que *Phytophthora* spp. (Macdonald 1982 ; Blaker et Macdonald 1986 ; Bouchibi et Coll., 1990 ; Snapp et Coll. ,1991 ; Sanogo 2004).

Nachmiais et al, (1993) ont étudié l'effet de la salinité et son interaction avec deux maladies de la pomme de terre le flétrissement dû à *verticillium dahliae* et le blight précocose causé par *Alternaria Solani* ces auteurs ont rapporté une hausse dans l'expression des symptômes chez les plantes cultivées en milieu semi aride et arrosées avec des eaux à différent degrés de salinité.

La salinité peut affecter différemment l'aptitude des champignons phytopathogènes à produire les enzymes cellulolytique in vitro (**El Abyad et al ,1992**).Ainsi *Sclerotium rolfsii* et *Rhizoctonia Solani*, deux champignons du sol pathogènes sur la betterave voient leur aptitude à dégrader les parois cellulaires de leur hôte perturbée par le sel in vitro. Chez *S. rolfsii*, l'activité enzymatique augmente avec l'augmentation de la salinité du milieu, ce qui concorde avec nos résultats sur *Verticillium sp.*

III.5.3. Effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne pondérale et sur la quantité de protéines produites et l'activité enzymatique

Les résultats de l'effet du polyéthylène glycol sur la croissance mycélienne et la quantité des protéines produites dans les filtrats de cultures sont exposés dans les figures, les résultats des figures montrent que la croissance mycélienne pondérale diminue pour toutes les doses, et la quantité de protéines produites augmente chez l'isolat V124 et diminue chez l'isolat Vx à des doses de 3g/L, 2g/L, 9g/L.]

Nos résultats sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du *Verticillium sp* montrent une diminution de L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase sauf pour l'isolat V124 à une concentration de 2g/L

Les présents résultats ont montrés que L'activité enzymatique endo-B-1,4 glucanase diminue à une dose de 2g/L et augmente à une dose de 4g/L

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Ce travail s'inscrit dans un programme de recherche destiné à combattre le *verticillium sp* (agent redoutable des cultures maraichère).il avait pour objectif d'évaluer in vitro l'impact des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne pondérale et les activités biologiques in vitro de deux isolats de *verticillium sp* prélevés de la culture de tomate en provenance de la région de Tébessa et de Tlemcen.

Les résultats obtenus ont démontré que les deux isolats présentent une variabilité culturale en présence des contraintes environnementales à savoir pH, PEG, NACL selon leur origine géographique.

.l'activité enzymatique B-1,4 glucosidase de l'isolat pathogène V124 est supérieure à celle de l'isolat pathogène Vx en milieu acide et basique ,le pH du milieu semble donc stimule la production d'enzyme in vitro chez les deux isolats de *verticillium* , l'isolat V124 semble plus efficient pour la production d'enzyme dans nos conditions expérimentales.

Nos résultats ont montré que les niveaux de salinité testés (2g|L, 4g|L, 9g|L) n'avaient pas d'effet négatif sur la croissance mycélienne pondérale et les quantités de protéines produites nous observons une diminution de la quantité de protéines produite à 9g|L et une stimulation de la croissance mycélienne pondérale chez l'isolat V124

La corrélation de Person au seuil de 1% et 5 % indique qu'il existe une corrélation significative ($p=0,00$) entre l'activité B-1,4 glucosidase et l'activité endo-B-1,4 glucanase.

L'effet du PEG sur L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase du *Verticillium sp* montrent une diminution de L'activité enzymatique B-1,4 glucosidase sauf pour l'isolat V124 à une concentration de 2g|

Dans les travaux futurs, il serait intéressant de faire une étude plus approfondie en élargissant le nombre d'isolat étudiés avec la possibilité d'élargir d'autres aspects de la diversité, il serait également intéressant d'évaluer l'effet de ces facteurs sur le stade de formation de sclérotés (stade de conservation au niveaux du sol) chez ce

champignon tellurique en culture in vitro ainsi que sur le développement et la sévérité de cette maladie de dépérissement des cultures in vivo, Il serait intéressant d'établir une relation entre le comportement morphologique et culturale de ces isolats et leur pouvoir pathogène (agressivité et virulence) en les testant in vivo sur les variétés de tomates sensibles par exemple .

Ainsi, les informations qui en découleront et celles obtenues in vitro pourront éventuellement servir pour élaborer des plants stratégiques de lutte contre ce pathogène dangereux du sol.

REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES

- Acharya, S, N.and Huang .H.C, (2003).Breeding alfalfa for resistance to *verticillium wilt* A sound strategy.
- Afailal A, 1987.Manifestation de la verticilliose sur les tomates sensibles et résistantes : effets de la salinité sur le développement des deux races de *Verticillium dahliae kleb* et sur la réaction des plantes à l'agent pathogène. Thèse de doctorat; Université Mohamed V; 127p.
- Bateman D.1969.Some characteristics of the cellulose system produced by *Sclerotium rolfsii* sacc.Phytopathology 59:37-42.
- Benyacoub, 1993.étude in vitro de l'antagonisme du *stachybotris elegans* vi à via du *Rhizoctonia Solani* (GA3).Diplôme du grade maitre, Université Laval, 118P. Berger C ,2012.
- Besri M ,1977.étude de quelques aspects de l'écologie de *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* et de *Verticillium dahliae kleb* .le long du littoral atlantique marocaine. Thèse de doctorat; Université de Nancy ; 199p.
- Besri M, 1981.Qualité des sols et des eaux d'irrigation et manifestation des trachéomycoses de la tomate au Maroc.phytopathologia méditerrané, Vol 20, n°2|3 :107-111.
- Besri M, and Afailal A, 1993.Effect of water salt content on the development of *verticillium wilt* on resistant tomato cultivar .Proceeding of the 6 international congress of plant pathology. July 28 August 6; Montreal Canada.
- Bhat, R.Subbarao, K.1999.Host rang specificity in *Verticillium dahliae* phytopathologie 89(12):1218-1225
- Blancard, (2013) *Verticillium dahlia Kleb Verticillium albo-atrum Reinke & Berthold*.
- Bourbos V.A.and Skoudridakis, M.T., (1996).Solarisation for the control of *verticillium wilts* of greenhouse tomato.phytoparasitica 24(4):277-280.

- Cooper M, and Wood R, 1975.Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *fusarium oxysporum* F.S.P.lycopersici.Physiologcol plant pathology 5:135-156.
- Cooper R, Ranking B ,Wood R,1978.Cell wall degrading enzymes of vascular wall fungi .prospective and modes of actions of polysacchridases of *verticillium* and *fusarium oxysporum* F.S.P.lycopersici.Physiologcol plant pathology 13:101-134.
- Durrand and Cooper R.M, 1988. The role of pectinases in vascular wilt disease as determined by defined mutant of *verticillium albo-atrum* .physiological and Molecular plant pathology 32:363-371.
- El Aissami A, Lahlou H.1999.Adaptation progressive à la luzerne d'un isolat de *Verticillium dahliae* de la tomate .Bulletin 29,191-195.
- Elbebany.A, Rampitsch, C.Daayf.F. (2010).proteomic analysis of the phytopathogenic soil borne fungus *verticillium wilt* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. *Proteomic*, 10(2):289-303
- Erwin D.C, 1981.chemical control in fungal disease of plants. (Ed.M.E.Mace, AA, AA. Bell and C.H.Beckman), p 563-594.
- Fradin.E.F, Thomma.B.P. 2006 .physiology and molecular aspects of *Verticillium wilt* diseases caused by *verticillium wilt* and *verticillium albo-arum* .mol.plant.pathol, 7:71-86.
- Fradin, E.F, and Thomma, B.P.(2006).physiology and molecular aspects of *Verticillium wilt* Fradin; E.F.and Thomma, B.P.diseases caused by *Verticillium wilt* and *V.albo-atrum* .Mol. Plant Pathol.7:71-86.
- Isaac .I.1967.Speciation in *verticillium* .Annual Review of phytopathologie, 5:201-222.
- Inderbitzin P ,R .M Davis ,T.Usami,H.w Platt and K.V Subbaroo .2011.Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *verticillium* ,with the descriptions of five new speciese ,Edited by Alexander Idnurm.plosone 6(12):e28341:doi:10:1311 journal .pone.0028341.

- Jabnoun –Khiareddine, H.Daami-Remadi, M.Ayed F.Jebari H. (2007). An incidence of verticillium wilts OG melon in Tunisia .*Afr.J.plant Sci.biotechnol*, 56:726-726.
- Klebahn H.1913 Beitrage zur Kenntnis derfungi imperfecti I, Ein Verticillium-Krankheit auf dahliae, *Mycologisches zentralblatt* 3:49-66
- Klosterman SJ,Atallah ZK,Vallad GE,Subbarao KV.2009.Diversity,pathogenicity and management of Verticillium species.*Annu .Rev.Phytopathol*, 47:39-62
- Lopez-Escudero F.J,Mercado; J,Valverde ,A;Blanco,M.A.2009.Effect of agronomical factors in the importance of verticillium wilt of olive in the Guadalquivir valley in Andalucía .10th In verticillium symposium, book of abstracts,corfu island ,Hellas;96p.
- Malcolm; G.M.Kuldau, G.A, Gugino, B.K, and Jimenez-Gasco, M.del M. (2013).Hidden Host Plant Associations of soil borne fungal pathogens: An ecological perspective. *Phytopathology* 103:538-544.
- Martin.2011.Application du compost et de fumigent pour lutter verticilliose du fraisier .thèse .Doct .D’etat.Univ.Laval (Canada) .108P
- Mass, J.1998.compendium of strawberry diseases .second edition .APS press, St. Paul MN.128p.
- Meyer R, Slater V.and Dubery I, 1994.A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex produced by verticillium dahliae, *Phytochemistry* 35(6):1449-1453.
- Pegg, E.F.and Brady, B.L.2002 .Verticillium wilts .Editeur: CAB international .CAIB Publishing, Wallingford, UK.552P.
- Prieto; Navarro-Raya, C.Valverde .A; Amyotte, S.Dobinson, K. (2009).colonization process of olive tissues by Verticillium dahliae and it’s in planta interaction with the biocontrol root entophyte pseudomonas fluorescens PICF.*Microb, Biotechnol*.2:499-511.
- Rapilly F ,1968.Les techniques de mycologie en pathologie végétale .Annales des Epiphytes, vol.19.Institut National de la recherche Agronomique, Paris, 102p.
- Tjamos C.1989.Problems and prospects in controlling *Verticillium wilt* .in: vascular wilt diseases of plants (Ed.by Tjamos; E.C: Beckman, c.) 441-456.

-Vallad, G.E.and Subbarao, K.V. (2008).colonization of resistant and susceptible lettuce by a green fluorescent protein –tagged isolate of *Verticillium dahliae* .phytopathology 98:871-885.

-Veronese .P, Narasimham, L, Steven.R.A.2003. Identification of a locus controlling *verticillium* diseases symptom response in *Arabidopsis thaliana* .plant, J, 35:547-587

-Wang H.Hwang S.F, chang K.F,Gossen B.D.Turnbull G.D,Howard R.J.(2000).Foliar diseases of alfalfa in the peace River Region of Alberta in 1999. Plant Disease survey; 80:68-69.

-wood R, 1960.Pectic and cellulytic enzymes in plant diseases (2-3) Abstract.Annu.Rev.Physiol.11:299-322.

ANNEXES

ANNEXE1 : MILIEU DE CULTURE

Préparation du milieu de culture PDA (Rapilly 1968) :

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
L'eau distillée	1000ml

Peler, laver couper en tranches minces les pommes de terre, cuire 15 à 20min dans 200ml d'eau distillée, filtrer sur compresse et presser. Ajouter le glucose au filtrat, compléter le volume à 1000ml, ajuster le pH à 6.8 et ajouter l'agar, autoclave 20min à 120°C.

ANNEXE 2 : composition du réactif de Bradford

-Bleu de Coomassie (BBC) R250.....100mg

-Ethanol (Sigma-Aldrich) à 95%.....50ml

Après agitation pendant 2heurs à l'abrie de la lumière on ajoute :

-Acide ortho phosphorique (Sigma-Aldrich) à 85%100ml

-Eau distillée q.s.p..... 1000ml

ANNEXE 3: ANALYSE STATISTIQUE

Poids Vx (mg Ms)

Test de Tukey

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
pH	N	1
4,0	3	135,000000
9,0	3	150,833333
6,8 (Témoin)	3	180,733333
Signification		,297

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Poids V124 (mg Ms)

Test de Tukey

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
pH	N	1
9,0	3	97,600000
4,0	3	126,866667
6,8 (Témoin)	3	164,066667
Signification		,288

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

**Glucanase VX $\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose}$ |
g Ms).**

Test de Tukey

pH	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
9,0	3	5,30533
6,8 (Témoin)	3	7,84033
4,0	3	8,63433
Signification		,244

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

GlucanaseV124 $\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose}$ |g Ms).

Test de Tukey

pH	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
4,0	3	1,91200	
9,0	3		13,78700
6,8 (Témoin)	3		13,91400
Signification		1,000	,985

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Glucosidase Vx ($\mu\text{mol}\backslash\text{min de } D\text{-nitrophényle}\backslash\text{g MS}$).

Test de Tukey

pH	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
9,0	3	71,95867	126,25433
4,0	3	81,54633	
6,8 (Témoin)	3		
Signification		,176	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

GlucosidaseV124 ($\mu\text{mol}\backslash\text{min de } D\text{-nitrophényle}\backslash\text{g MS}$).

Test de Tukey

pH	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
6,8 (Témoin)	3	118,55667
4,0	3	119,10633
9,0	3	120,85900
Signification		,989

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Protéine Vx (mg \g Ms).

Test de Tukey

pH	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
9,0	3	1,56967
4,0	3	2,15533
6,8 (Témoin)	3	2,23467
Signification		,347

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Protéine V124 (mg \g Ms).**Test de Tukey**

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
pH	N	1
4,0	3	1,86933
6,8 (Témoin)	3	2,21167
9,0	3	2,33933
Signification		,298

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Poids vx (mg Ms)**Test de Tukey**

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
Dose en Nacl	N	1
9 g/L	3	159,700000
2 g/L	3	163,133333
4 g/L	3	170,100000
Témoin	3	180,733333
Signification		,847

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Poids V124 (mg Ms)

Test de Tukey

Dose en Nacl	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	
4 g/L	3	147,500000	
Témoin	3	164,066667	
2 g/L	3	169,333333	
9 g/L	3	177,266667	
Signification		,623	

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Glucanase VX $\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose}$ [g Ms).

Test de Tukey

Dose en Nacl	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	
4 g/L	3	6,319000	
9 g/L	3	7,789667	
Témoin	3	7,840278	
2 g/L	3	7,940000	
Signification		,916	

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

GlucanaseV124 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose}$ [g Ms).

Test de Tukey

Dose en Nacl	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	
9 g/L	3	13,615667	
Témoin	3	13,914352	
2 g/L	3	13,958333	
4 g/L	3	14,028000	
Signification		,992	

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Glucosidase Vx ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS).

Test de Tukey

Dose en Nacl	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
2 g/L	3	21,477667		
9 g/L	3		64,398667	
4 g/L	3		75,945000	
Témoin	3			126,254296
Signification		1,000	,488	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

GlucosidaseV124 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS).

Test de Tukey

Dose en Nacl	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
2 g/L	3	66,769667	
9 g/L	3	80,549667	80,549667
4 g/L	3	104,777000	104,777000
Témoin	3		118,556701
Signification		,082	,082

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Protéine Vx (mg /g Ms).

Test de Tukey

Dose en Nacl	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
9 g/L	3	2,012333
2 g/L	3	2,067000
4 g/L	3	2,158333
Témoin	3	2,234747
Signification		,135

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Protéine V124 (mg /g Ms).

Test de Tukey

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
Dose en Nacl	N	1
9 g/L	3	1,977000
Témoin	3	2,211682
2 g/L	3	2,271667
4 g/L	3	2,333000
Signification		,789

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Poids Vx (mg Ms)

Test de Tukey

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
Dose PEG	N	1
3	3,00	144,37
2	3,00	148,47
4	3,00	163,90
0 (Témoin)	3,00	180,73
Signification		0,72

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Poids V124 (mg Ms)

Test de Tukey

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05
Dose PEG	N	1
3	3,00	142,87
4	3,00	153,70
2	3,00	160,50
0 (Témoin)	3,00	164,07
Signification		0,80

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Glucanase VX ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose}$ |g Ms).

Test de Tukey

Dose PEG	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
0 (Témoïn)	3,00	7,84	
3	3,00	10,10	
2	3,00	10,73	10,73
4	3,00		13,98
Signification		0,15	0,10

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

GlucanaseV124 ($\mu\text{mol}/\text{min eq. Glucose}$ |g Ms).

Test de Tukey

Dose PEG	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
2	3,00	8,57		
4	3,00		11,00	
0 (Témoïn)	3,00			13,91
3	3,00			14,54
Signification		1,00	1,00	0,84

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Glucosidase Vx ($\mu\text{mol}/\text{min de D-nitrophényle}$ |g MS).

Test de Tukey

Dose PEG	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
3	3,00	63,40	
4	3,00	66,36	
2	3,00	94,23	94,23
0 (Témoïn)	3,00		126,25
Signification		0,25	0,23

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Glucosidase V124 ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de *D*-nitrophényle/g MS).

Test de Tukey

Dose PEG	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
4	3,00	79,48		
3	3,00	90,45	90,45	
0 (Témoin)	3,00		118,56	118,56
2	3,00			133,44
Signification		0,80	0,17	0,63

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Protéine Vx (mg /g Ms).

Test de Tukey

Dose PEG	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
3	3,00	1,52
2	3,00	1,91
4	3,00	1,99
0 (Témoin)	3,00	2,23
Signification		0,26

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Protéine V124 (mg /g Ms).

Test de Tukey

Dose PEG	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
0 (Témoin)	3,00	2,21
4	3,00	2,33
2	3,00	2,34
3	3,00	2,38
Signification		0,26

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

